UNIVERSITATEA „AL. I. CUZA“ IAŞI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

Naela Costică Mihaela Niță
Lăcrămioara Ivănescu

COORDONATOR:
Constantin Toma

CITOLOGIE VEGETALĂ

Manual de lucrări practice

EDITURA UNIVERSITĂȚII „ALEXANDRU IOAN CUZA“ IAŞI

Scanned with OKEN Scanner

UNIVERSITATEA "AL.I. CUZA" IAŞI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

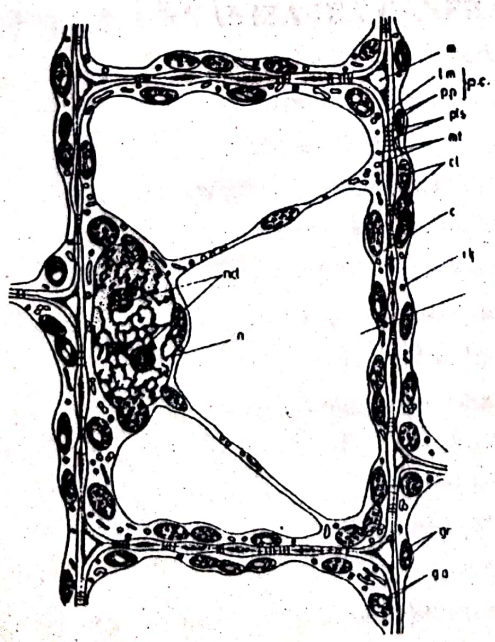
Naela COSTICĂ *Mihaela NIŢĂ*

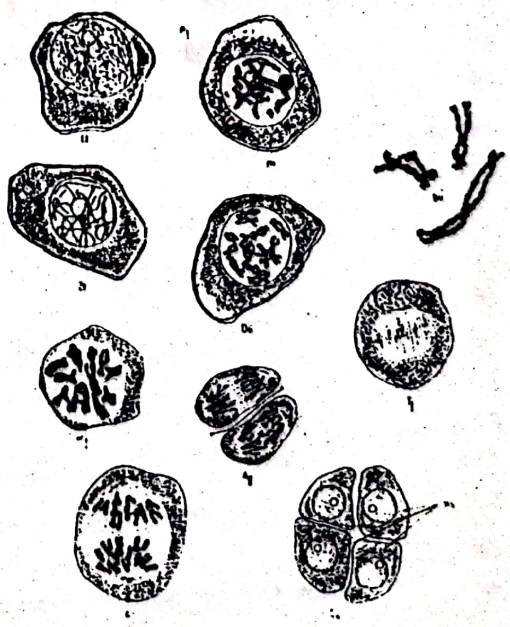
Lăcrămioara IVĂNESCU

Coordonator: Constantin TOMA

CITOLOGIE VEGETALĂ

Manual de lucrări practice





EDITURA UNIVERSITĂŢII "AL.I. CUZA"
IAŞI - 2001

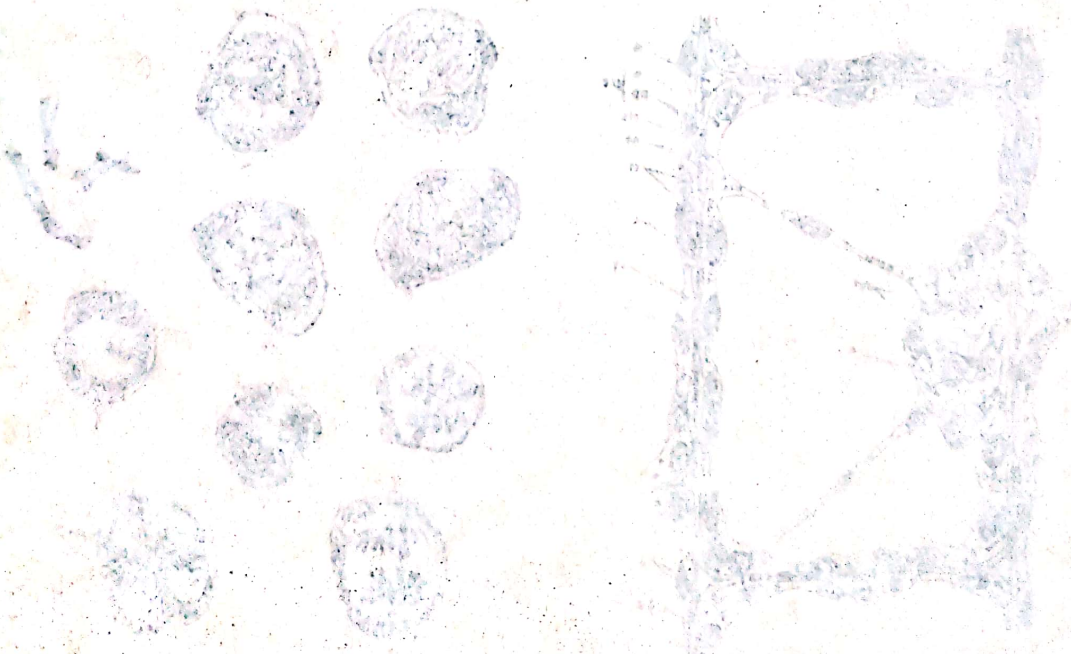
Scanned with OKEN Scanner

Caietul de lucrări practice a fost analizat de o comisie formată din:

Prof. univ. dr. *Toader CHIFU*
Universitatea "Al.I. Cuza" Iaşi - Facultatea de Biologie

Prof. univ. dr. *Georgeta FILIPESCU*
Universitatea "Al.I. Cuza" Iaşi - Facultatea de Biologie

Prof. univ. dr. *Ion I. BĂRA*
Universitatea "Al.I. Cuza" Iaşi - Facultatea de Biologie



Culegere text: *Carmen SCHIN*
Tehnoredactare computerizată: ing. *Paula BORTAŞ*

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

INTRODUCERE 3

Capitolul I. NOŢIUNI SUMARE DESPRE MICROSCOAPE ŞI TEHNICI DE LABORATOR 6

Microscoape fotonice 6

a. Microscopul fotonic obişnuit 6

b. Microscopul cu fluorescenţă 15

c. Microscopul cu contrast de fază 17

d. Microscopul cu fond întunecat 17

e. Microscopul polarizant 18

f. Microscopul cu raze ultraviolete 19

Microscoape electronice 20

a. Microscopul electronic cu transmisie 22

b. Microscopul electronic cu baleiaj 24

Bazele tehnicii microscopice 25

Tehnici de lucru în microscopia fotonică 26

Tehnici de lucru în microscopia electronică cu transmisie . 39

Tehnici de lucru în microscopia electronică cu baleiaj 50

Capitolul II. ORGANIZAREA GENERALĂ A CELULEI VEGETALE 52

Observarea formei şi dimensiunilor celulelor vegetale 52

Forma 52

Dimensiunile 55

Principalii constituenţi celulari 57

1. Observarea celulelor neclorofiliene 57

1° Celula vie 57

2° Celula moartă 61

3° Celula fixată şi colorată 61

2. Observarea celulelor clorofiliene 62

Peretele celular 63

1° Evidenţierea lamelei mediane 64

2° Evidenţierea îngroşărilor celulozice şi a punctuaţiilor 65

Membranele biologice: plasmalema, tonoplastul . . . 66

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul III. CITOPLASMA 73
Mişcările (curenţii) citoplasmei 73
Organite citoplasmatice 75
1. Condriomul 77
2. Plastidomul 78
1° Amiloplastele 79
2° Cloroplastele 83
Studiul cromatoforilor la algele verzi 83
Studiul cloroplastelor la plantele superioare . 85
3° Carotenoplastele 87
4° Leucoplastele 91
5° Transformarea plastidelor 92
Transformarea amiloplastelor în cloroplaste . 92
Transformarea cloroplastelor în carotenoplaste 93
3. Nucleul 95
1° Studiul nucleului interfazic 95
1.1. La procariote 95
1.2. La eucariote 96
2° Studiul nucleului în diviziune 99
Mitoza 99
Meioza 102

Capitolul IV. VACUOMUL 108
1. Coloraţia vitală a vacuolei 108
2. Studiul câtorva conţinuturi vacuolare 109
1° Substanţe vacuolare dizolvate şi colorate 109
2° Conţinut vacuolar cristalizat în mod natural 111
3° Conţinut vacuolar cristalizabil prin deshidratare artificială 112
4° Conţinut vacuolar caracterizat prin acţiunea reactivilor specifici 115
3. Evoluţia sistemului vacuolar 117
1° Evoluţia vacuolelor într-un organ în creştere 117
2° Evoluţia vacuolelor într-o sămânţă complet matură 119
3° Evoluţia vacuolelor într-o sămânţă în curs de germinare . 120

Capitolul V. PERMEABILITATEA CELULARĂ 122
1. Permeabilitatea pentru apă 122
1.1. Plasmoliza 122

Scanned with OKEN Scanner

1.2. Deplasmoliza 125
2. Permeabilitatea pentru substanţe dizolvate 128
2.1. Pătrunderea substanţei dizolvate în citoplasmă 128
2.2. Pătrunderea substanţei dizolvate în vacuolă 130

Capitolul VI. INCLUZIUNI ERGASTICE (INERTE)
1. Studiul granulelor de amidon 134
2. Studiul granulelor de aleuronă 138
3. Studiul cristalelor de oxalat de calciu 140

Capitolul VII. PERETELE CELULAR 143
1. Studiul celulozei peretelui celular 143
2. Studiul punctuaţiilor şi plasmodesmelor 143
1⁰ Punctuaţiile simple 143
2⁰ Plasmodesmele 145
3⁰ Punctuaţiile areolate 146
3. Îngroşările peretelui celulozo-pectic 147
1⁰ Îngroşările centrifugale 147
2⁰ Îngroşările centripetale 149
4. Modificările chimice secundare ale peretelui celular 152
1⁰ Cutinizarea 152
2⁰ Cerificarea 154
3⁰ Suberificarea 155
4⁰ Lignificarea 156
5⁰ Mineralizarea 158
6⁰ Gelificarea 160

Capitolul VIII. DIFERENŢIEREA CELULARĂ: ELEMENTE CONDUCĂTOARE ŞI MECANICE 163
1. Localizarea elementelor conducătoare 163
1.1. Studiul ţesutului lemnos 164
1.2. Studiul ţesutului liberian 166
2. Localizarea elementelor mecanice 169
Studiul colenchimului 169

Scanned with OKEN Scanner

INTRODUCERE

Celula este unitatea fundamentală morfo-fiziologică a vieţii, adică cea mai mică formă de organizare susceptibilă a îndeplini funcţiile necesare menţinerii stării vii: metabolism, creştere, reproducere.

Elementele celulare fiind în majoritatea lor invizibile cu ochiul liber, istoria celulei datează de la inventarea microscopului şi progresele citologiei sunt strâns legate de perfecţionările acestui instrument de cercetare.

Termenul de celulă a fost introdus de **Hooke**, în 1665, pentru a defini cămăruţele, ce amintesc de acelea de la un fagure din stupul de albine, pe care le-a observat la microscop într-o secţiune printr-un dop de plută.

Dar abia spre mijlocul secolului XIX s-a impus ***teoria celulară***, care arată că orice organism viu este constituit din celule. Acest rol de unitate structurală, intuit de **Dutrochet** în 1824, a fost stabilit în mod definitiv datorită lucrărilor botanistului **Schleiden** (1838) şi ale zoologului **Schwann** (1839). Totuşi, aceşti autori nu excludeau posibilitatea ca celulele să se poată organiza în mod spontan, pornind de la un mediu bogat în materii organice, adică prin generaţia spontanee; abia mai târziu s-a impus noţiunea de ***continuitate celulară,*** conform căreia celula nu poate avea decât o singură origine, diviziunea unei celule preexistente: **omnis cellula e cellula** (**Virchow**, 1858).

În perioada ce a urmat, un număr considerabil de lucrări a fost consacrat studiului celulei. Se realizează mari progrese, îndeosebi datorită cercetărilor lui **Abbé**, în construcţia microscoapelor fotonice şi în punerea la punct a metodelor de fixare şi de colorare a structurilor celulare tot mai fine şi mai precise.

Între 1860 şi 1900 sunt descoperite şi studiate principalele organite celulare. Între 1920 şi 1930 fusese stabilită deja o schemă generală de structură a celulei, comună pentru fiinţele vegetale şi animale. Între 1940 şi 1950, progresele biochimiei, care au permis izolarea organitelor şi studiul rolului lor în economia celulară, precum şi acelea ale citologiei datorate inaugurării unui nou aparat de studiu **microscopul electronic** (lucrările lui **Claude, Palade, Porter, Duve, Buvat, Frey-Wyssling, Muhlethaler** ş.a), au repus în discuţie diviziunile stabilite până atunci în lumea vie: regnul vegetal şi regnul animal, în diferitele lor subregnuri. Se stabileşte existenţa a două forme de organizare celulară: **celula procariotă** şi **celula eucariotă;** diferenţa între fiinţele vii ce prezintă aceste tipuri de organizare este mult mai importanţă decât cea care fusese considerată ca majoră între plante şi animale.

Scanned with OKEN Scanner

Celula procariotă şi celula eucariotă

Celula este o cavitate închisă, limitată la exterior de o membrană lipo-proteică (iar în cazul plantelor şi de un perete celulozo-pectic), al cărei conţinut prezintă o compoziţie diferită de cea a mediului înconjurător. Menţinerea, în decursul vieţii celulare, a acestei diferenţe de compoziţie presupune că **membrana joacă un rol de barieră.** Funcţionarea celulei necesită totuşi numeroase schimburi cu mediul înconjurător: absorbţia de elemente noi pentru a asigura metabolismul şi creşterea, eliminarea produselor de deşeu. Celula este un *sistem termodinamic deschis*. Pentru a menţine compoziţia sa constantă, membrana ectoplasmică sau **plasmalema** trebuie să controleze aceste schimburi, deci ea este o *barieră selectivă*.

Conţinutul celular este repartizat în două teritorii: unul central, **regiunea nucleară**, unde este localizat materialul genetic răspunzător de transmiterea informaţiei care dirijează sintezele celulare; altul periferic, **citoplasma,** cuprins între plasmalemă şi regiunea nucleară. Tocmai plecând de la organizarea teritoriului nuclear se deosebesc cele două categorii de celule: ***eucariote*** şi ***procariote***.

La eucariote, teritorul nuclear este separat de restul celulei printr-o anvelopă formată din două membrane lipo-proteice comparabile cu plasmalema; acestui teritoriu i s-a dat numele de **nucleu.** La procariote nu există nici o frontieră materializată între teritoriile nuclear şi citoplasmic. Pe lângă anvelopa nucleară există numeroase alte diferenţe structurale şi funcţionale, care contribuie la stabilirea deosebirii celor două forme de organizare celulară.

Trăsături proprii celulei vegetale

1. Prezenţa **peretelui celular**, în compoziţia căruia intră în principal celuloză, hemiceluloze, substanţe pectice; uneori proteine, lipide, lignină, tanin, săruri, minerale; are rol în apărare, creştere, receptarea stimulilor externi, regimul hidric, diviziune.

2. Strâns legate de perete sunt **punctuaţiile şi plasmodesmele**, ce asigură relaţiile structural-funcţionale dintre celulele unui ţesut; în locul lor, la celulele animale sunt structuri analoage numite joncţiuni.

3. În compoziţia chimică a **plasmalemei** predomină galactozildigliceridele; la celulele animale predomină fosfatidilcolina şi fosfatidiletanolamina.

4. Prezenţa **vacuolelor** (ce se măresc treptat), care determină creşterea în volum a celulelor; la animale, creşterea celulelor se realizează prin sporirea cantităţii de citoplasmă; sistemul vacuolar, mult mai dezvoltat ca la animale, poate atinge 90 % din volumul celulei definitive şi conţine enzime litice (hidrolaze); la animale aceste substanţe

Scanned with OKEN Scanner

se găsesc în lizozomi.

5. Prezenţa **plastidelor** incolore şi colorate, cele verzi asigurând autotrofia plantelor verzi.

6. Prezenţa **microcorpilor** implicaţi în procese proprii celulei vegetale: *peroxizomii* - în fotorespiraţie, *glioxizomii* - în conversia lipidelor în glucide simple, asimilabile de către embrion în timpul germinării seminţelor oleaginoase.

7. Prezenţa **corpilor paramurali** (lomazomi şi plasmalemazomi), implicaţi în formarea peretelui celular.

8. Prezenţa unei mari diversităţi de **substanţe de rezervă** (amidon, inulină, laminarină, aleuronă, ulei ş.a.); la animale este caracteristic glicogenul.

9. Prezenţa **cristalelor** de săruri organice (oxalat de calciu) şi minerale (sulfat de calciu).

Elementele componente ale celulei vegetale sunt:

- **protoplasma**: totalitatea structurilor celulare vii (citoplasma, nucleul, condriozomii, plastidele)
- **paraplasma**; totalitatea produşilor rezultaţi din activitatea protoplasmei (peretele, vacuolele, incluziunile solide)
- **metaplasma**: formaţiunile extracelulare (cili, flageli)

sau

- **peretele** celulozo-pectic
- **protoplastul**: conţinutul celulei (fără perete)
- **protoplasma**: protoplastul fără incluziuni (hialoplasma cu organitele sau partea vie, inclusiv nucleul)
- **citoplasma**: hialoplasma cu organitele (dar fără nucleu), din spaţiul delimitat de plasmalemă şi membrana nucleară
- **hialoplasma**: substanţa fundamentală a celulei, fără organite
- **organitele**: cu *membrană dublă*: nucleu, mitocondrii, plastide; cu *membrană simplă*: reticul endoplasmic, aparat Golgi, lizozomi, sferozomi, lomazomi, peroxizomi, glioxizomi; *fără membrană*: ribozomi, microtubuli, cili, flageli, centrul celular

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL I

NOŢIUNI SUMARE DESPRE MICROSCOAPE ŞI TEHNICI DE LABORATOR

MICROSCOAPE FOTONICE

Microscopul fotonic este instrumentul optic care, utilizând ca sursă fotonul, măreşte obiectele sau structurile foarte mici, invizibile cu ochiul liber.

În microscopia fotonică, analiza citologică este limitată de puterea de separare sau de rezoluţie a instrumentului, aceasta fiind calitatea esenţială a unui microscop.

Puterea de rezoluţie reprezintă cea mai mică distanţă la care două puncte ale obiectului de cercetat pot fi văzute distinct. Se consideră că limita maximă pentru rezoluţia microscopului fotonic este de 0,2 μm, valoare care nu poate fi depăşită din cauza lungimii de undă mari a fotonului.

Prin montarea unor dispozitive speciale la microscopul fotonic obişnuit, se pot realiza:

* microscopul cu fluorescenţă
* microscopul cu contrast de fază
* microscopul cu fond întunecat
* microscopul polarizant
* microscopul cu raze ultraviolete

a. Microscopul fotonic obişnuit

Microscopul utilizat curent în laborator este alcătuit din două părţi principale: partea mecanică şi partea optică (Fig. 1).

Scanned with OKEN Scanner

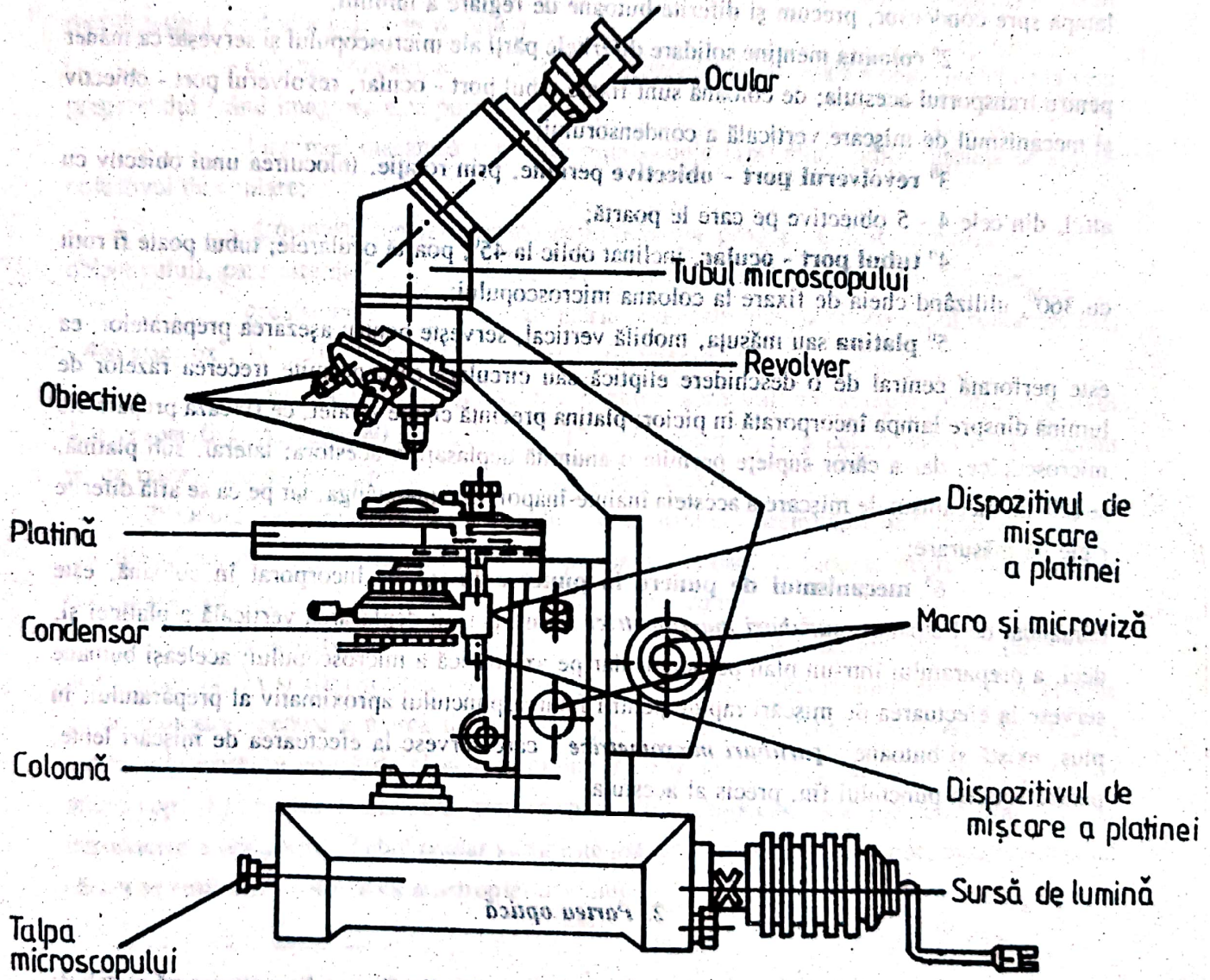


Fig. 1. Alcătuirea microscopului fotonic (d. Cotrutz şi colab.)

Scanned with OKEN Scanner

1. Partea mecanică

Stativul cuprinde:

1⁰ **piciorul**, talpa sau soclul, adesea triunghiular ori în formă de potcoavă, asigură stabilitatea microscopului; în el se află lampa, oglinda şi orificiul de pătrundere a luminii dinspre lampă spre condensor, precum şi diferite butoane de reglare a luminii;

2⁰ **coloana** menţine solidare diferitele părţi ale microscopului şi serveşte ca mâner pentru transportul acestuia; de coloană sunt fixate tubul port - ocular, revolverul port - obiectiv şi mecanismul de mişcare verticală a condensorului;

3⁰ **revolverul port - obiective** permite, prin rotaţie, înlocuirea unui obiectiv cu altul, din cele 4 - 5 obiective pe care le poartă;

4⁰ **tubul port - ocular**, înclinat oblic la 45⁰, poartă ocularele; tubul poate fi rotit cu 360⁰, ulilizând cheia de fixare la coloana microscopului;

5⁰ **platina** sau măsuţa, mobilă vertical, serveşte pentru aşezarea preparatelor; ea este perforată central de o deschidere eliptică sau circulară care permite trecerea razelor de lumină dinspre lampa încorporată în picior; platina prezintă cleme - valet, ce fixează preparatele microscopice, dar a căror supleţe permite o anumită deplasare a acestora; lateral, sub platină, se află un mecanism de mişcare a acesteia înainte-înapoi, dreapta-stânga, iar pe ea se află diferite rigle de măsurare;

6⁰ **mecanismul de punere la punct a imaginii**, încorporat în coloană, este comandat de butoane - ***şuruburi macrometrice*** - care permit deplasarea verticală a platinei şi, deci, a preparatului într-un plan perpendicular pe axa optică a microscopului; aceleaşi butoane servesc la efectuarea de mişcări rapide pentru fixarea punctului aproximativ al preparatului; în plus, există şi butoane - ***şuruburi micrometrice*** - care servesc la efectuarea de mişcări lente, pentru fixarea punctului fin, precis al acestuia.

2. Partea optică

1⁰ **Obiectivele** sunt constituite dintr-un sistem de lentile dispuse într-o montură metalică; lentila vizibilă şi îndreptată spre platină se numeşte *frontală*. Fiecare obiectiv are înscrise pe montura metalică anumite caracteristici:

Scanned with OKEN Scanner

- deschiderea numerică (apertura), ce exprimă unghiul maxim sub care razele de lumină dinspre preparatul microscopic pot pătrunde în interiorul sistemului optic; ea este constantă pentru un acelaşi con luminos, oricare ar fi mediul traversat (apă, glicerină, ulei de cedru, balsam); la microscopul românesc ML - 4M este de 0,1 - ob. 6x; 0,3 - ob. 10x; 0,4 - ob 20x; 0,6 - ob 40x; 1,25 - ob 90x. Deschiderea numerică (a) se calculează făcând produsul dintre sinusul jumătăţii unghiului de deschidere a conului luminos (u) după refracţie, şi indicele de refracţie a mediului (n): $a = n \cdot \sin u$

- distanţa frontală, adică distanţa ce separă lentila frontală a obiectivului de lamela preparatului (când imaginea este pusă la punct);

- lungimea mecanică a tubului microscopic (160 mm), adică distanţa ce separă obiectivul de oculare;

- grosimea lamelei (pentru care refracţia produsă a fost corectată la nivelul obiectivului), care este de 0,17 mm (lama port - obiect având de regulă 0,8 - 1,2 mm);

- grosismentul sau puterea de mărire a obiectivului; la microscopul românesc ML - 4M este: 6x*, 10x, 20x, 40x şi 90x - obiectiv de imersie**);

- uneori se specifică şi tipul corecţiei (ex. acromat); de exemplu, pentru obiectivul 40x se specifică: Acromat 40 x 0,65/160 - 0,17; acest obiectiv, ca şi cel cu imersie, este montat pe un resort care asigură protecţia lentilei şi a preparatului.

2⁰ **Ocularele** sunt formate din două lentile montate la extremităţile unei monturi metalice (cu diametrul de 23,2 mm) introdusă în partea superioară a tubului microscopic; lentila superioară este numită *ocular*ă, iar cea interioară, *colectoare*.

Cele două oculare au înscrise pe ele grosismentul (în cazul microscopului românesc ML - 4 M fiind: 5x, 7x şi 10x) şi chiar tipul corecţiei (ex. acromat); uneori, unul din oculare conţine un ac indicator, pentru a marca detaliul observat la microscop. Binocularul este prevăzut la partea inferioară cu coadă de rândunică circulară, prin intermediul căreia se poate monta pe microscop. La partea superioară sunt dispuse tuburile-ocular, cu diametre standard de introducere a ocularelor. Tubul ocular stâng este prevăzut cu inelul dioptriilor, prin intermediul căruia se realizează corectarea ametropiei ochiului.

---

* folosit cu valoare de lupă, pentru circumscrierea imaginii generale a obiectului examinat

** folosit pentru detalii de mare finețe; în acest caz se pune o picătură de ulei de cedru între lamelă şi lentila frontală a obiectului

Scanned with OKEN Scanner

3° **Lampa**, încorporată în picior, serveşte ca sursă luminoasă (de regulă se foloseşte un bec de 6V - 15W). Dispozitivul de iluminare oferă posibilitatea centrării filamentului sursei de iluminare, prin acţionarea unei bucşe ce orientează în plan filamentul sursei.

Alimentarea dispozitivului de iluminare de la transformator se realizează prin intermediul cablului de alimentare. Transformatorul 16 VA se utilizează ca măsură de siguranţă împotriva tensiunilor de atingere periculoase. Alimentarea de la reţeaua de tensiune 220 V - 50 Hz se realizează prin intermediul cordonului de alimentare prevăzut cu fişă bipolară, cu contact de protecţie lateral.

4° **Oglinda**, cuprinde oglinda propriu-zisă (cu o faţă plană şi alta concavă) şi furca oglinzii, ce permite rabatarea în plan a oglinzii, precum şi rotirea sa, astfel încât aceasta să se poată orienta după dorinţă.

5° **Condensorul**, localizat sub platină, este compus dintr-un sistem de lentile. Funcţia sa esenţială este de a proiecta, în planul preparatului, imaginea sursei luminoase. Sub condensor se află diafragma - iris (cu apertura de 1,4) ce funcţionează ca cea a unui aparat fotografic. Deschiderea sa este reglată de o manetă mobilă în plan orizontal. Ea permite limitarea câmpului luminat şi obţinerea de conuri luminoase din ce în ce mai strâmte.În funcţie de puterea de mărire a obiectivelor se schimbă şi apertura acestora, de la 1,4 la 0,35. Condensorul se poate apropia sau depărta vertical de platină datorită unui mecanism montat în coloana microscopului.

FORMAREA IMAGINII MICROSCOPICE

Cunoscând partea optică a microscopului, putem analiza foarte sumar, traiectoria razelor luminoase în aparat şi realiza modul în care se produce imaginea virtuală pe care o înregistrăm în timp ce analizăm un preparat (Fig. 2).

Să presupunem, pentru a simplifica expunerea, că ocularul şi obiectivul ar fi formate fiecare dintr-o singură lentilă. Razele luminoase dinspre lampă pătrund în condensor şi luminează obiectul de cercetat cu un con luminos a cărui lărgime este determinată de deschiderea diafragmei.

Fie: ab - obiectul, OB - obiectivul, OC - ocularul, f - centrul obiectivului, f' - centrul ocularului.

Obiectivul OB dă obiectului ab o imagine reală, mărită şi inversată a'b'. Această imagine se formează în centrul f' al lentilei - ocular. Lentila - ocular măreşte imaginea a'b' aşa cum face

Scanned with OKEN Scanner

o lupă şi ochiul observatorului percepe deci, prin aceasta din urmă, imaginea virtuală, dreaptă şi mărită a"b" a imaginii reale a'b'.

GROSISMENTUL

Grosismentul total depinde de grosismentul obiectivelor şi ocularelor utilizate. Grosismentele în diametru sunt următoarele:

Grosismentele dintre diferite oculare şi obiective

Oculare	Obiective					
	6x	10x	20x	25x	40x	90x imersie
7x	42	70	140	175	280	630
10x	60	100	200	250	400	900
15x	90	150	300	375	600	1350
20x	120	200	400	500	800	1800
40x	240	400	800	1000	1600	3600

PREPARATUL MICROSCOPIC

Preparatul microscopic este compus din:

- port - obiect: lamă de sticlă de +/- 75 x 25 mm, cu grosimea de +/- 1,5 mm;
- obiect - acoperitor: lamelă de sticlă foarte subţire (0,17 mm), de dimensiuni variabile (15 x 15 mm, 24 x 24 mm,...);
- obiect de examinat: plasat într-un mediu de montaj corespunzător (apă, glicerină, glicero - gelatină, balsam de Canada), între port - obiect şi obiectul - acoperitor.

Scanned with OKEN Scanner

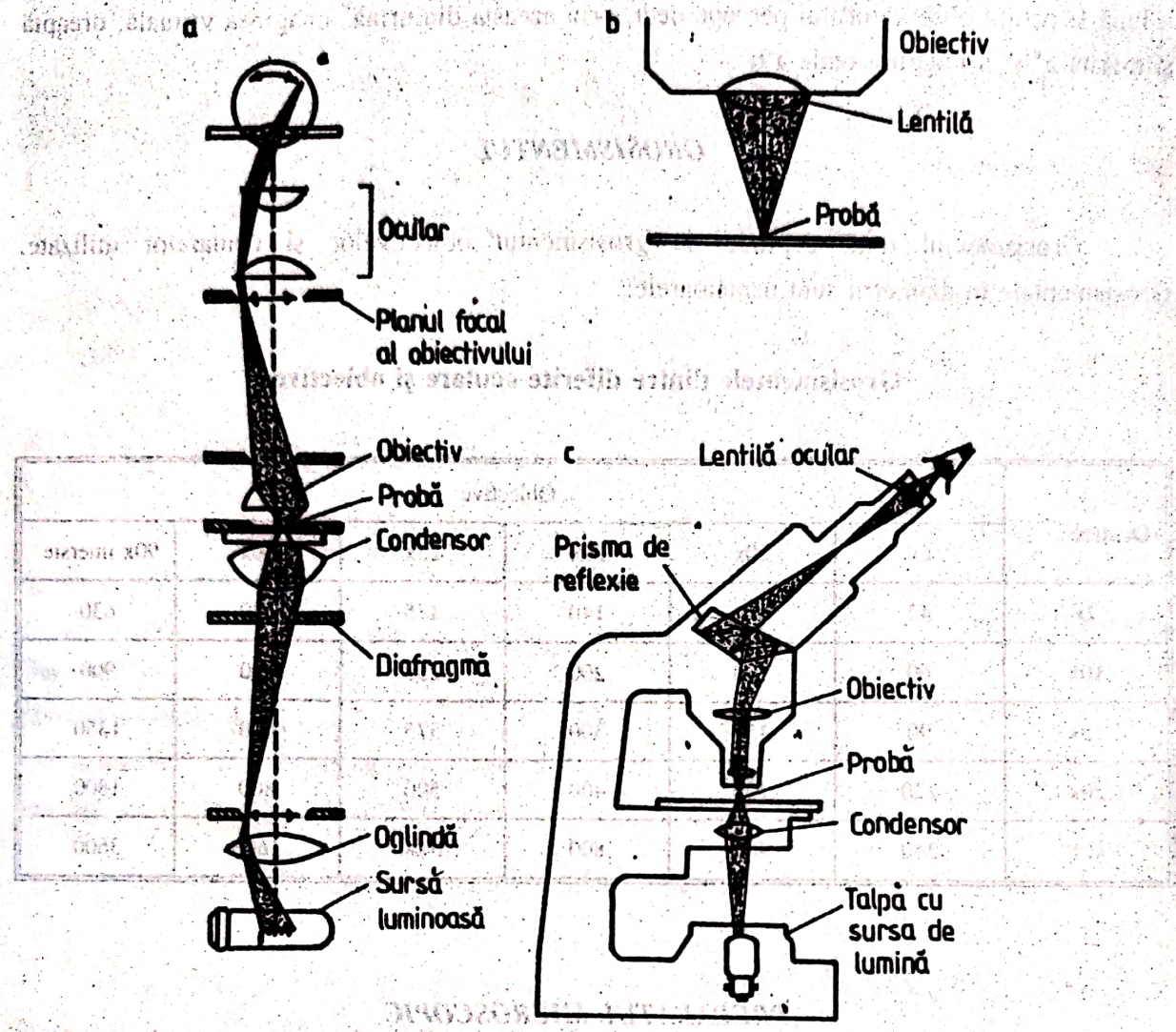


Fig. 2. Sursa de lumină, partea optică şi formarea imaginii la microscopul fotonic (d. Cotrutz şi colab.)

UTILIZAREA MICROSCOPULUI

1. Cu grosisment slab

1⁰ Se aduce în poziţie de lucru ocularul 5x şi obiectivul 10 x.

2⁰ Se conectează cordonul lămpii de iluminat la sursa electrică (eventual, se utilizează un întrerupător).

3⁰ Se fixează distanţa interpupilară a observatorului, urmată de privirea în ambele oculare.

Scanned with OKEN Scanner

4° Se roteşte inelul dioptriilor astfel încât imaginile observate prin cele două oculare să fie identice.

5° Se deplasează pe verticală condensorul, cu ajutorul mecanismului de sub platină, până apare în câmpul microscopului (în acelaşi plan cu preparatul) imaginea diafragmei de câmp.

6° Se reglează unghiul oglinzii din piciorul microscopului.

7° Dacă fluxul luminos este prea puternic, reducerea lui se realizează introducând un filtru fumuriu, cu care este echipat microscopul.

8° Privind lateral platina, se plasează preparatul microscopic în aşa fel încât obiectul de studiu să fie bine iluminat (preparatul se va ţine în poziţie orizontală, cu lamela orientată în sus).

9° Se fixează preparatul cu una din clemele - valet.

10° Se face punerea la punct a imaginii microscopice acţionând şurubul macrometric (butonul utilizat pentru mişcare rapidă). Lentila frontală a obiectivului trebuie să se găsească la aproximativ 1 - 1,5 cm de preparat; această distanţă, numită " frontală", este constantă pentru un obiectiv dat, oricare ar fi ocularul folosit. Din momentul în care apare imaginea obiectului de examinat se foloseşte numai şurubul micrometric (butonul utilizat pentru mişcare lentă).

11° Se reglează luminozitatea cu ajutorul diafragmei.

12° Se înlocuieşte ocularul slab cu unul mai puternic (10x).

13° Se verifică punerea la punct a imaginii prin mişcări lente ale şurubului micrometric.

2. Cu grosisment mijlociu

Se procedează ca mai sus, apoi:

1° Se roteşte revolverul (fără a atinge lentilele obiectivelor) astfel încât obiectivul mijlociu (20x) să ia locul celui slab (10 x).

2° Se reglează imaginea cu ajutorul şurubului micrometric.

3° Se reglează luminozitatea cu ajutorul diafragmei.

4° Se înlocuieşte ocularul slab cu ocularul puternic.

5° Se reglează imaginea, prin punerea la punct cu ajutorul şurubului micrometric.

3. Cu grosisment puternic

Pentru a trece la un obiectiv puternic (40 x) obiectiv la care se foloseşte doar şurubul micrometric, se efectuează aceleaşi operaţii

Dacă observarea necesită utilizarea unui obiectiv puternic, este necesară totdeauna:

Scanned with OKEN Scanner

1⁰ Punerea la punct a imaginii şi reglarea luminozităţii cu obiectivul slab (10 x), pentru a avea o vedere de ansamblu a preparatului.

2⁰ Punerea la punct a imaginii şi reglarea luminozităţii cu obiectivul mijlociu (20 x), după ce s-a ales (deplasând lent preparatul) regiunea de observat a secţiunii.

3⁰ Punerea la punct a imaginii şi reglarea luminozităţii cu obiectivul puternic (40 x), pentru a observa detaliile zonei alese.

Pentru a trece de la obiectivul puternic la cel slab, operaţiile sunt inverse.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1⁰ Mişcarea lentă a şurubului micrometric trebuie să fie o manipulare constantă în cursul observării. Aceasta serveşte nu numai la punerea la punct a imaginii (clarificare), ci şi la explorarea preparatului în profunzime. La grosisment slab, punerea la punct se efectuează cu ajutorul mişcărilor mai mult sau mai puţin rapide şi lente. La grosisment mijlociu şi puternic nu se fac manipulări decât prin mişcări lente.

2⁰ Trebuie evitată atingerea puternică a lentilei frontale a obiectivului de preparatul microscopic; unul sau celălalt s-ar putea deteriora.

3⁰ Nu se deşurubează niciodată componentele ocularelor şi ale obiectivelor.

4⁰ Dacă o lentilă este murdară, trebuie ştearsă cu un material curat şi moale, niciodată cu degetele.

5⁰ Dacă, la grosisment puternic, preparatul apare "neclar" sau dacă punerea la punct a imaginii este greu de realizat, trebuie verificat dacă lamela este amplasată corect; dacă da, se înlocuieşte sau se netezeşte lama.

6⁰ Deschiderea diafragmei trebuie reglată pentru fiecare preparat şi pentru fiecare grosisment, în vederea obţinerii unei imagini bine contrastate.

7⁰ La încetarea lucrului cu microscopul, în axul acestuia se lasă totdeauna obiectivul slab (10 x), se întrerupe cordonul de la sursa luminoasă şi se acoperă aparatul cu o husă.

Scanned with OKEN Scanner

MODUL DE ÎNTREŢINERE ŞI DE PĂSTRARE A MICROSCOPULUI

1° După folosire, microscopul trebuie şters şi acoperit cu o husă (din pânză sau din material plastic de culoare închisă).

2° Ştergerea componentelor optice se va face cu vată sau cu o batistă de finet înmuiate în alcool etilic.

3° Feţele frontale ale obiectivelor şi condensorului, precum şi uleiul de cedru vor fi şterse cu vată înmuiată în xilen sau benzen.

4° Se recomandă ca obiectivul 90x (cu imersie), să fie prins pe capul revolver numai atunci când se foloseşte; după folosire el se scoate şi se pune în cutia de păstrare a microscopului.

5° Dacă se constată că şurubul macrometric merge prea uşor sau prea greu, se poate reface reglajul astfel: se rotesc butoanele de antrenare ale dispozitivului mişcării rapide unul faţă de celălalt. În acest scop, butonul din stânga se ţine fix, rotindu-se butonul din dreapta. Rotirea în sensul acelor de ceasornic duce la îngreunarea mişcării dispozitivului, iar în sens invers îl slăbeşte.

6° Microscopul trebuie depozitat în încăperi închise, lipsite de medii corozive, praf, lumină, cu umiditate maximă de 65 %, în limitele de temperatură 0° - +35° C.

b. Microscopul cu fluorescenţă

Foloseşte radiaţii ultraviolete, cu lungime de undă scurtă şi cu frecvenţă înaltă. Aceste radiaţii invizibile, în contact cu substanţele fluorescente (luminiscente) din preparatele biologice, se transformă în raze fluorescente, cu lungime de undă mare şi frecvenţă joasă, ce dau o imagine vizibilă şi colorată, care poate fi înregistrată de retină sau de placa fotografică (Fig. 3).

Ca sursă de lumină se foloseşte lampa cu vapori de mercur. Razele luminoase, până ajung la oglindă, trec printr-un sistem de filtrare special şi ajung în cele din urmă în preparat, având lungime de undă de 3660 Å. Selectarea razelor este realizată şi cu ajutorul lentilelor de cuarţ ale lămpii şi condensorului, precum şi de sticla specială din care este confecţionată lama port-obiect. Ocularul microscopului este prevăzut cu un filtru special care elimină excesul de lumină şi efectul dăunător pentru ochi.

Razele ultraviolete, trecând prin preparat, produc o luminiscenţă vizibilă a structurilor, capabile de fluorescenţă naturală (primară) sau artificială (secundară).

Scanned with OKEN Scanner

Unele structuri sunt autofluorescente (clorofila din cloroplaste, sclereidele, fibrele de sclerenchim, vasele de lemn), altele sunt lipsite de fluorescenţă naturală. Acestea din urmă sunt tratate special, cu substanţe numite fluorocromi, pentru a le conferi artificial fluorescenţa. Fluorocromii sunt absorbiţi selectiv de structurile celulare şi în contact cu radiaţiile ultraviolete produc fluorescenţă. Dintre fluorocromi se utilizează mai frecvent acridina, primulina şi fluorosceina.

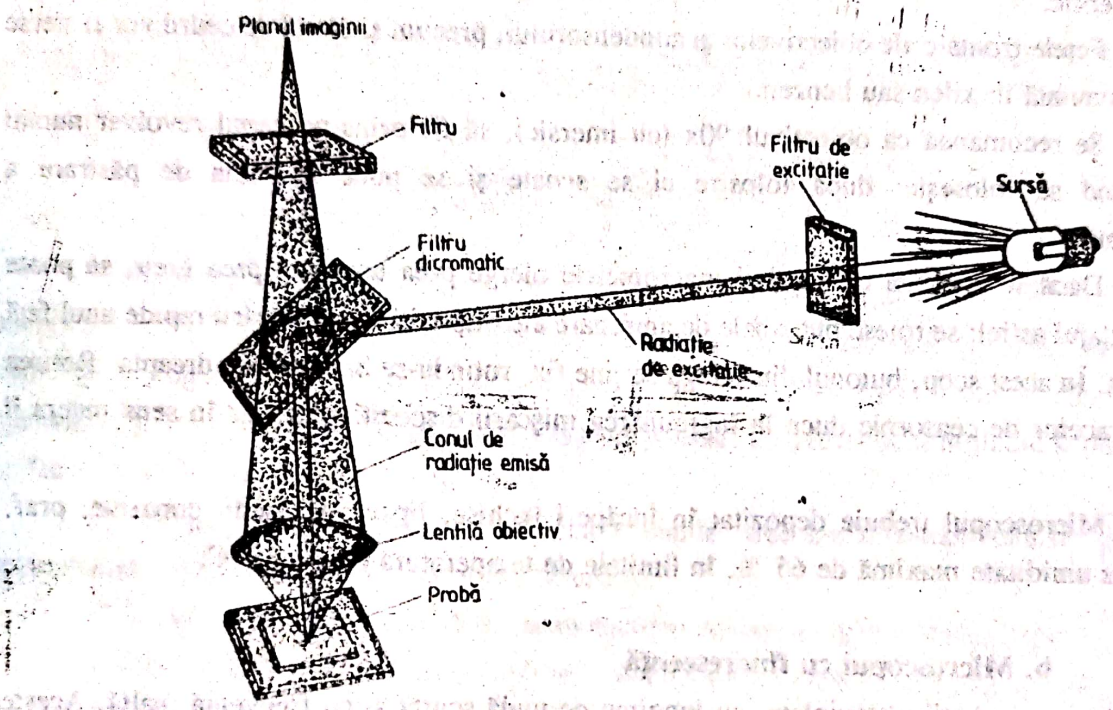


Fig. 3. Reprezentarea schematică a microscopului cu fluorescenţă (d. Cotrutz şi colab.)

Studiul fluorescenţei primare

În acest scop se folosesc secţiuni obţinute prin material proaspăt şi incluse în apă sau glicerină.

Culorile de fluorescenţă care se observă variază în funcţie de ţesuturi. Astfel, cuticula apare de culoare albure, peretu celulelor epidermice au nuanţe de albastru deschis, parenchimul cortical este colorat în verde sau brun, cloroplastele în roşu intens şi liberul, în albastru. Xilemul se observă în diferite culori: albastru verzui, violet sau chiar în galben.

Culoarea de fluorescenţă a lemnului variază de obicei cu gradul de lignificare a pereţilor, precum şi cu vârsta lemnului, cel secundar fiind mai intens fluorescent decât cel primar. Fibrele

de sclerenchim cu pereţii intens lignificaţi prezintă nuanţe de verde-gălbui.

În general, culorile de fluorescenţă se modifică sub acţiunea diferitelor substanţe incluse în ţesuturile respective. Cu toate acestea, analiza secţiunilor fitoanatomice în fluorescenţă primară contribuie la identificarea rapidă a diverselor ţesuturi.

c. Microscopul cu contrast de fază

Este astfel construit încât realizează o accentuare a diferenţelor de fază suferite de razele luminoase ce traversează un preparat. Acest fapt duce la evidenţierea clară a celor mai fine structuri. El acţionează în mod separat, fie asupra razelor care vin direct de la sursă, fie asupra celor care sunt difractate de structura complexă a preparatului (Fig. 4).

Faţă de microscopul fotonic obişnuit, cel cu contrast de fază este prevăzut cu un dispozitiv special - **diafragma inelară** - care are rolul de a separa fasciculul de raze directe de cel de raze difractate. Preparatul microscopic analizat reflectă şi difractă lumina prin structura lui complexă; fiecare component structural acţionează ca o sursă de lumină. Cele **două fascicule (direct şi difractat)** întâlnesc în drumul lor un alt dispozitiv - **placa de fază** - care acţionează asupra unuia din fascicule, pe care-l difuzează diferit faţă de celălalt. În cele din urmă, în planul imaginii diferenţele de fază sunt transformate prin fenomene de interferenţă, în diferenţe de intensitate luminoasă perceptibilă vederii. Se pot analiza preparate colorate, care se observă mult mai bine ca de obicei (de ex. diviziunea celulară); mai potrivite sunt însă, preparatele slab colorate sau necolorate, cu celule în stare vie.

d. Microscopul cu fond întunecat

Este un microscop cu fond obişnuit, prevăzut cu un dispozitiv special pentru a lumina preparatul lateral, perpendicular pe axă (lumina indirectă).

Pentru aceasta microscopul cu fond negru foloseşte un condensor special care împiedică pătrunderea directă a razelor luminoase în obiectiv; preparatul este iluminat numai în lumină oblică.

Fiecare particulă care interceptează lumina devine o sursă luminoasă şi trimite lumina în toate direcţiile. Ca rezultat, materialul de cercetat apare luminat strălucitor pe un fond întunecat. Datorită acestui fapt, obiectele foarte mici şi greu de colorat sau puţin refringente devin vizibile. Principiul acestui microscop are la bază fenomenul Tyndall: particulele foarte fine de pulberi existente în aer, invizibile în lumina directă din cauza dimensiunilor lor, devin vizibile cu ochiul

Scanned with OKEN Scanner

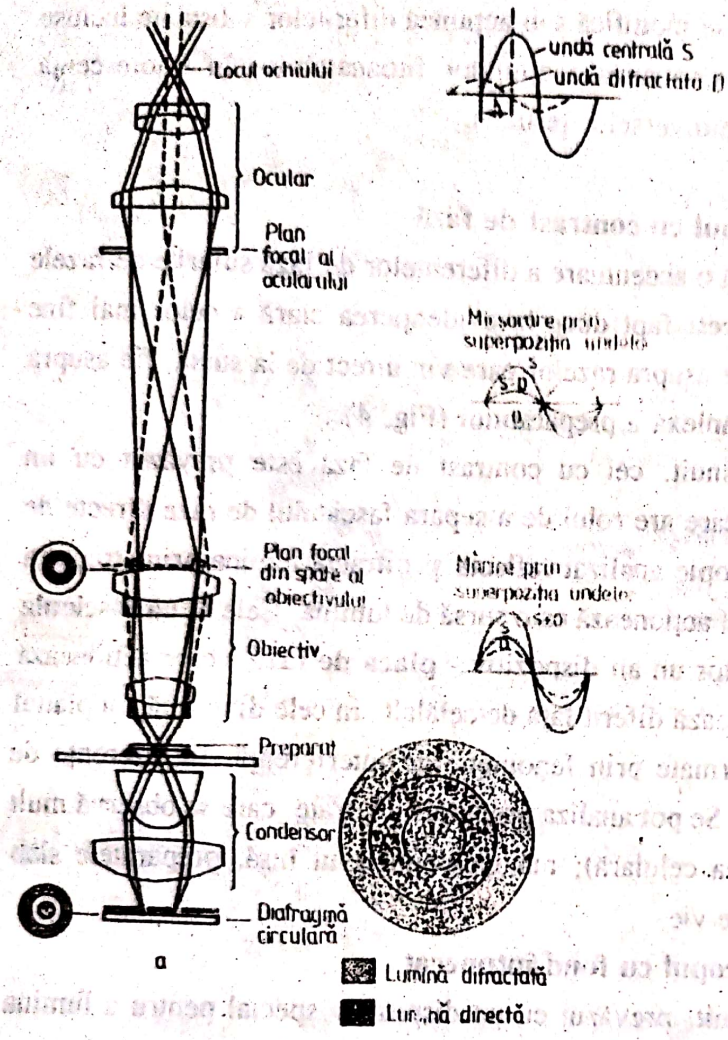


Fig.4. Schema de principiu a microscopului cu contrast de fază (d. Cotrutz şi colab.)

liber atunci când se lovesc în drumul lor de raze luminoase care pătrund într-o cameră întunecoasă printr-un orificiu. Şi în cazul microscopului cu câmp întunecat, posibilitatea de a observa este limitată, fie de dimensiunile extrem de mici ale particulei care nu interceptează o cantitate suficientă de lumină pentru a impresiona retina, fie de iluminarea insuficientă.

Pentru a putea lucra cu acest microscop este necesar să se respecte următoarele recomandări:

* lama de sticlă să nu aibă o grosime mai mare de 1,0 -1,1 mm, pentru a se evita refracţia luminii;
* preparatul trebuie să fie foarte subţire (unistratificat), pentru a evita difuzarea luminii;
* să se lucreze cu obiective de imersie;
* să se folosească o sursă foarte puternică de lumină;

c. Microscopul polarizant

Constituie o variantă a microscopului fotonic, care în locul luminii normale utilizează lumina polarizantă; prezintă două filtre polarizante (prisme Nicol): **polarizor**, situat între sursa de lumină şi obiect şi, respectiv **analizor** localizat deasupra ocularului (fiind posibilă rotirea lui ca o placă turnantă) (Fig. 5). Dacă planul de polarizare al analizatorului este perpendicular pe

cel al polarizorului, lumina nu va fi transmisă. Punând pe platina microscopului un preparat birefringent, planul de polarizare va devia datorită întârzierii provocate de întreruperea probei de examinat. Se roteşte preparatul până când în câmpul microscopului apar puncte cu luminozitate maximă şi minimă.

Prin această metodă (tehnică) se pot studia structurile a căror compoziţie macromoleculară are un aspect liniar, cristalin, cum ar fi celuloza din pereţii celulari, amidonul din amiloplaste, sferocristalele de inulină ş.a.

f. Microscopul cu raze ultraviolete

Este un microscop fotonic care, în loc de lumină al ă (λ = 5600 Å), foloseşte raze ultraviolete invizibile, cu lungime de undă mult mai mică (λ = 2700 - 3600 Å) şi lentile de cuarţ. Razele ultraviolete trec prin preparat şi sunt înregistrate, nu de retină, fiind invizibile, ci de o placă fotografică.

Folosind raze cu lungime de undă mai mică decât microscopul fotonic, puterea de rezoluţie se ridică până la 100 Å. De altfel, această cifră reprezintă limita maximă de rezoluţie a microscopiei fotonice, în general.

Acest tip de microscop are dezavantajul că nu permite analiza directă a preparatelor, ci indirectă, prin intermediul fotografiilor.

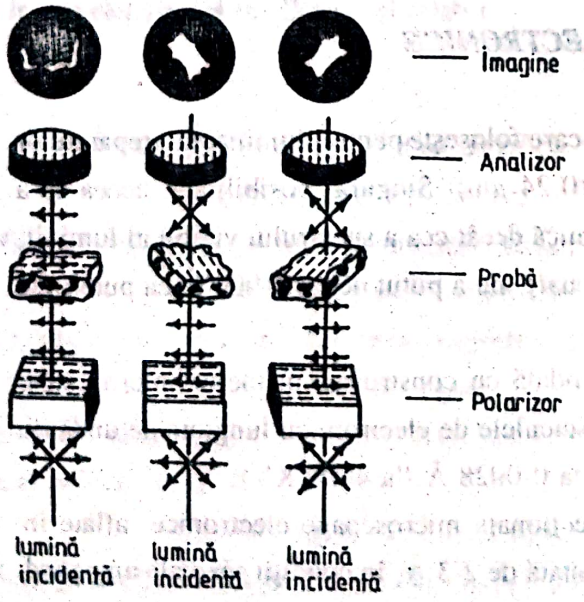


Fig. 5. Schema optică a variaţiilor luminoase de maxim şi de minim ale unui obiect anizotropic, când acesta este plasat între un analizor şi un polarizor şi este rotit cu un unghi de +/- 45⁰ (d. Cotrutz şi colab.)

De la optica fotonică la optica electronică

În 1876, *Abbé* a arătat că limitele microscopiei, utilizând lumina obişnuită, ar fi în principal imputabile caracterului ondulatoriu al radiaţiilor. De aceea încep să se utilizeze surse macroscopice de mică lungime de undă (radiaţii ultraviolete; raze X).

Scanned with OKEN Scanner

Treptat se ajunge la utilizarea razelor electronice, cărora *De Broglie* le recunoaşte, în 1924, natura ondulatorie. În 1927, *Busch* demonstrează că o bobină magnetică acţionează asupra electronilor, aşa cum face o lentilă asupra razelor luminoase. *Knoll şi Ruska* construiesc în 1931, primele **lentile electronice** care, după cercetările lui *Bruche, Davisson* şi *Calbick* sunt clasificate în 2 categorii: **a)** lentile magnetice; **b)** lentile electrostatice.

Şi astfel, primul **microscop electronic** cu mare putere de rezoluţie este pus la punct în 1933 de *Ruska* şi *von Borries*. În 1937, *Marton* publică primele imagini electronice din preparate de celule.

Cu ajutorul microscopului electronic, citologia progresează într-un mod remarcabil. În câţiva ani, cunoaşterea celulei se va îmbogăţi cu noţiuni complet noi.

În principiu, realizarea imaginii la microscopul electronic nu diferă de microscoapele obişnuite, fotonice (Fig. 6). Astfel, ca şi la microscopul fotonic, este necesară o sursă de radiaţii de natură electromagnetică, aşa numita radiaţie X a cărei lungime de undă este însă de 10^5-10^6 mai mică decât a radiaţiei verzi, aflată la jumătatea spectrului vizibil (λX=0,1-0,01 Å, λV=5500 Å), deci sub 0,1 Å ceea ce vă permite detalieri morfo-structurale de ordinul angströmului. Reamintim că scara de 1 Å este scara atomică (Fig. 7).

Comparativ, limitele de rezoluţie sunt: cu ochiul liber - 0,07 - 0,08 mm; la microscopul obişnuit - 0,5 μm ;la microscopul cu imersie - 0,3 μm; la microscopul cu raze ultraviolete -0,15 μm; la ultramicroscop - 6 nm; la microscopul electronic - 1,5 - 0,5 nm

MICROSCOAPE ELECTRONICE

Puterea de rezoluţie a microscopului fotonic, care foloseşte pentru iluminarea preparatelor radiaţii vizibile, nu poate depăşi limita de 2430 Å (0,24 μm). Singura posibilitate, aceea de a utiliza radiţia ultravioletă, cu lungime de undă mai mică decât cea a spectrului vizibil al luminii, în microscopul cu ultraviolete echipat cu lentile de cuarţ, nu a putut depăşi 1000 Å ca putere de rezoluţie.

Depăşirea limitelor invizibilului a avut loc odată cu construirea primelor microscoape electronice. Acestea folosesc ca sursă luminoasă, fasciculele de electroni cu lungime de undă de la 0,0859 Å (la tensiunea de accelerare de 20 KV) la 0.0028 Å (la 4000 KV).

După *Ploaie* şi *Petre (1979)* cele mai perfecţionate microscoape electronice, aflate în exploatare în diferite laboratoare au o rezoluţie garantată de 2-3 Å, în condiţii speciale ajungând

Scanned with OKEN Scanner

la 1,2 Å şi o putere maximă de mărire de 800.000 de ori. Asemenea performanţe permit biologului să studieze materia vie la nivel celular şi subcelular.

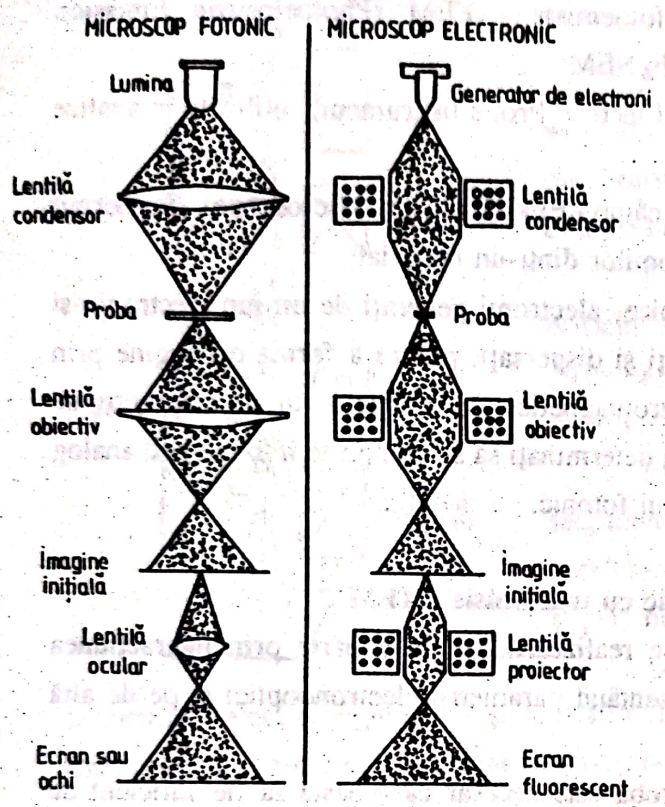


Fig. 6. Formarea imaginilor în microscopia fotonică şi în cea electronică (d. Cotrutz şi colab.)

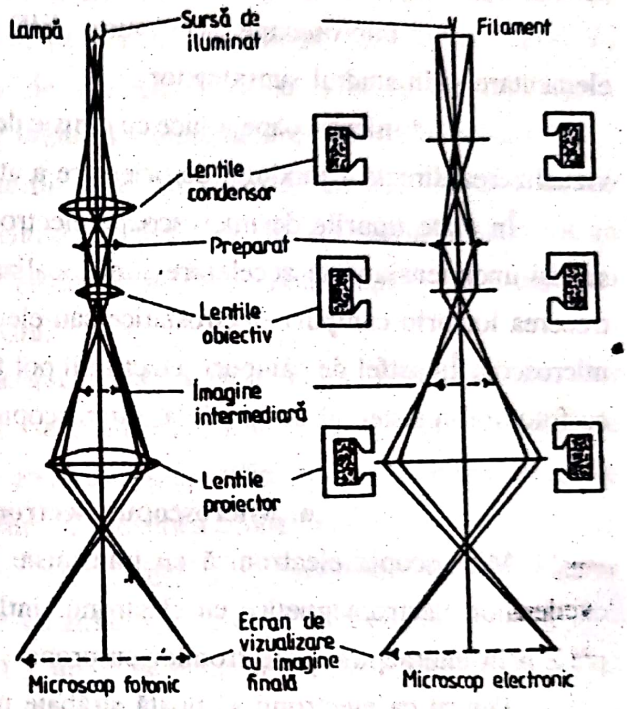


Fig. 7. Mersul razelor luminoase şi a radiaţiilor X în microscopia fotonică şi în cea electronică (d. Cotrutz şi colab.)

Microscoapele electronice se clasifică după tipul de construcţie şi destinaţia lor în:

* microscoape electronice cu transmisie - TEM (Transmission Electron Microscope), utilizate pentru cercetări ultrastructurale prin transmisie de electroni;

* microscoape electronice cu baleiaj - SEM (Scanning Electron Microscope), folosite la studiul ultramorfologiei suprafeţelor cu ajutorul electronilor secundari sau reflectaţi;

* microscoape electronice cu transmisie şi baleiaj - STEM (Scanning Transmission Electron Microscope), care permit studiul ultrastructural prin principiul TEM şi al suprafeţelor prin principiul SEM;

* microscoape electronice analitice cu transmisie - TEAM (Transmission Electron Analytical Microscope), cu aplicaţii în cercetările simultane ultrastructurale şi analitice;

Scanned with OKEN Scanner

* microscoape electronice sistemice, aparate complexe cu funcţionalitate de sistem, care permit cercetări multiple, simultane pe acelaşi preparat;

* microscoape electronice cu fotoemisie - PEM (Photoelectron Emission Microscope), cu aceleaşi aplicaţii ca acelea de tip SEM;

* microscoape electronice EPI (Electron Probe Instrument), utilizate în analize elementare şi în studiul suprafeţelor;

* microscoape ionice cu emisie de câmp - FIM (Field Ion Microscope) care permit vizualizarea directă a modului de orientare a atomilor dintr-un material.

În toate tipurile de microscoape electronice, electronii generaţi de un tun electronic şi supuşi unor tensiuni de accelerare sunt focalizaţi şi dispersaţi, pentru a forma o imagine prin trecerea lor prin câmpuri electrostatice sau electromagnetice, în funcţie de tipul constructiv de microscop. În astfel de câmpuri, electronii pot fi determinaţi să se comporte într-un mod analog cu fotonii din sistemul de lentile al microscopului fotonic.

a. Microscopul electronic cu transmisie - TEM

Microscopia electronică cu transmisie se realizează, pe de o parte prin interacţiunea câmpurilor electromagnetice cu electronii, influenţând parametrii electronooptici şi pe de altă parte prin interacţiunea electronilor cu proba.

Pentru ca electronii să poată străbate proba este necesar ca aceasta să fie suficient de subţire şi totodată, electronii să aibă energii de accelerare suficient de mari. Din acest punct de vedere deosebim: microscoape cu transmisie convenţionale (Conventional Transmission Electron Microscope - CTEM), care folosesc tensiuni de accelerare a electronilor până la 200 KV (pentru probele biologice se folosesc în mod curent tensiuni de 80 KV) şi microscoape cu voltaj înalt (High Voltage Electron Microscope - HVEM), care folosesc la accelerarea electronilor tensiuni de până la 300 KV. Elementele constitutive ale microscoapelor electronice de transmisie sunt: sistemul electronooptic, adăpostit în coloana microscopului, sistemul electronic şi consola de comandă, precum şi sistemul de vid (Fig. 8).

Sistemul electronooptic, la rândul său, este construit din: 1^0 sistemul de iluminare; 2^0 camera pentru preparat; 3^0 sistemul de formare a imaginii; 4^0 camera de observaţii; 5^0 camera fotografică.

1^0 Sistemul de iluminare cuprinde: tunul electronic şi lentilele condensor.

Tunul electronic este ansamblul catod-filament, cilindrul Wehnelt şi anod.

Scanned with OKEN Scanner

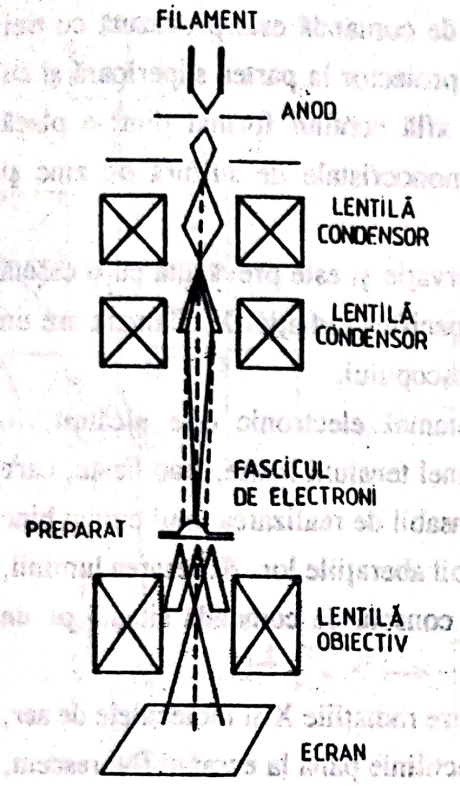


Fig. 8. Schema de organizare a microscopului electronic cu transmisie (d. Cotrutz şi colab.)

Filamentul, cu rol de **catod**, realizat din tungsten, wolfram sau hexaborură de lantan, sub forma literei V, este sursa de radiaţii X şi se găseşte în vecinătatea cilindrului Wehnelt - electrodul cu rol de focalizare.

Anodul este, în general, un disc metalic cu un orificiu central de 3-5 mm în diametru, având rol în dirijarea electronilor în axul optic al coloanei microscopului.

Energia ridicată a electronilor, necesară traversării secţiunilor, se realizează prin aplicarea unei tensiuni de accelerare anod-catod, specifică tipului de microscop, dar şi prin natura şi grosimea probelor.

Lentilele condensor servesc la focalizarea fasciculului electronic pe probă şi constau dintr-un ansamblu de două lentile: prima cu distanţa focală scurtă, care creează o imagine micşorată a sursei de electroni, a doua cu distanţa focală mărită, care transferă imaginea micşorată în planul obiect. În cazul utilizării microscopului la rezoluţii înalte, un rol decisiv îl joacă lentila condensor, fiindcă densitatea iluminării preparatului trebuie să fie foarte mare.

2° Camera pentru preparat este spaţiul din interiorul coloanei microscopului, dintre lentilele condensor şi lentilele de formare a imaginii, mărginit de două diafragme. Accesul se realizează printr-o cameră ecluză pentru adaptarea presiunilor, iar proba se aşează într-un orificiu din căsuţa preparatului apoi se introduce în axul optic al microscopului.

Secţiunile fixate pe grilă sunt manipulate prin intermediul port obiectului în interiorul şi în afara camerei; fluxul de particule loveşte perpendicular suprafaţa secţiunilor în toată grosimea lor, producând astfel difracţia razelor X. Fluxul, iniţial omogen, este "modulat" la trecerea prin grosimea secţiunii, reţinând astfel informaţiile ultrastructurale necesare.

3° Sistemul de formare a imaginii este realizat prin intermediul a trei sau patru lentile: obiectiv, intermediară (1 chiar 2 la microscoapele mai perfecţionate) şi proiector, toate, ca şi cele de tip condensor, fiind de tip electromagnetic.

Scanned with OKEN Scanner

4° Camera de observaţii, situată la nivelul panoului de comandă este prevăzută cu trei ferestre de vizualizare a imaginii; este în legătură cu lentila proiector la partea superioară şi cu caseta fotografică la partea inferioară. În interiorul ei se află ecranul format dintr-o placă metalică circulară acoperită cu o substanţă fluorescentă (monocristale de sulfură de zinc şi cadmiu).

5° Camera fotografică se găseşte sub camera de observaţie şi este prevăzută cu o casetă ce conţine 12 sau 24 plăci fotografice a căror emulsie este specifică radiaţiei X. Camera are un sistem de vidare aflat în conexiune directă cu coloana microscopului.

Sistemul electronic şi consola de comandă. Sistemul electronic este alcătuit, în principal, din două blocuri: unul responsabil de realizarea unei tensiuni înalte, stabilizate, care să permită obţinerea rezoluţiei propuse, al doilea fiind responsabil de realizarea unui curent bine stabilizat pentru alimentarea lentilelor, micşorând pe cât posibil aberaţiile lor. Accesarea luminii, rezoluţiei şi claritătii imaginii se realizează electronic prin consola de comandă situată pe un panou frontal.

Sistemul de vid. Pentru a împiedica interacţiunile dintre radiaţiile X şi moleculele de aer, deci obţinerea unui fascicul coerent cu o deplasare perfect rectilinie până la ecranul fluorescent, este necesară realizarea în coloana microscopului a unui vid de aproximativ 10^{-4} - 10^{-6} torr. Sistemul de vidare conţine una sau două pompe rotative care asigură un vid preliminar şi una de difuzie care ridică vidul la cotele cerute de rezoluţia microscopului.

Sistemul conţine şi o serie de supape normale şi automate cu rol de protecţie în timpul utilizării instrumentului.

b. Microscopul electronic cu baleiaj - SEM

SEM, spre deosebire de TEM, furnizează imagini tridimensionale ale suprafeţelor cercetate, însă nu poate oferi informaţii ultrastructurale din grosimea materialului; probele de cercetat pot atinge dimensiuni de ordinul centimetrilor. Formarea imaginii se bazează pe principiul emisiei electronilor secundari, reflectaţi în urma bombardării probei de către fasciculul primar de radiaţii X (Fig. 9).

Fasciculul de electroni cade sub un anumit unghi pe probă producând reflexii sub diferite unghiuri în funcţie de incidenţa particulei cu zona de impact.

Spotul de radiaţii baleiază în timp întreaga suprafaţă a probei, astfel încât pe ecran apare

Scanned with OKEN Scanner

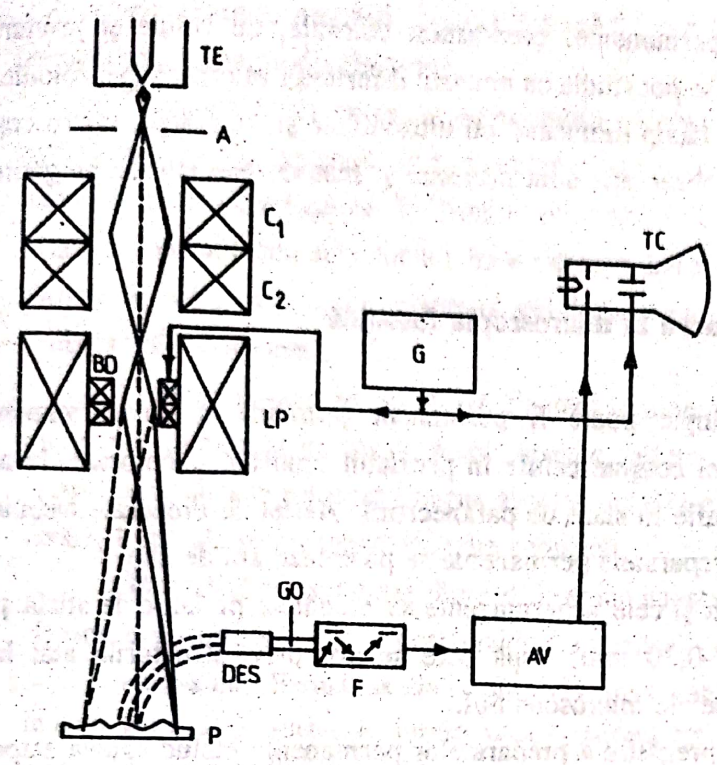


Fig. 9. Schema de organizare a microscopului electronic cu baleiaj: A - anod (electrod de accelerare); AV - amplificator video; BD - bobine de deflexie; C 1, 2 - lentile condensor; DES - detector de electroni secundari; F - fotomultiplicator; G - generator de baleiaj; GO - ghid optic; LP - lentilă proiector; P - preparat; TE - tun electronic; TC - tub catodic (d. cartea tehnică Tesla BS-340).

imaginea zonei scanate, la scară dorită.

Constructiv, SEM are în plus un detector de electroni secundari emişi în urma interacţiunii cu suprafaţa probei.

Curentul produs de acesta este modulat şi trimis în final spre blocul de baleiere al unui tub cinescopic situat într-un monitor.

Pregătirea probei pentru analiza cu un astfel de microscop este mai uşoară, nefiind necesară realizarea secţiunilor ultrafine. Condiţia principală impusă probelor examinate printr-o astfel de metodă este ca suprafaţa acestora să fie bună conducătoare pentru evitarea acumulării de sarcini electrice pe suprafaţă.

Probele neconducătoare se acoperă cu un strat fin de metal (Ag, Au, Pt, Pd), depus prin evaporare în vid, stratul realizând astfel neutralitatea electrică a suprafeţei, impusă de condiţiile specifice de lucru în microscopia cu baleiaj.

În cazul probelor biologice care conţin apă şi lichide volatile şi care sunt supuse evaporării în timpul baleierii datorită vidului existent în coloană, este necesară în prealabil, ca şi în microscopia de transmisie, deshidratarea şi eventual liofilizarea lor, înlăturându-se astfel, efectele nedorite.

BAZELE TEHNICII MICROSCOPICE

Tehnica microscopică reprezintă mijloacele de obţinere a preparatelor histologice şi principalele procedee de studiere a lor cu ajutorul microscopului. Există sute de metode diferite

Scanned with OKEN Scanner

care permit a obţine micropreparate permanente, contrastant colorate, cu celule şi ţesuturi animale şi vegetale. Astfel de preparate se pot studia cu ajutorul diferitelor microscoape: fotonic, cu contrast de fază, cu fluorescenţă, în câmp întunecat, cu ultraviolete şi, în sfârşit, microscop electronic. Pentru diferite mijloace de observaţie sunt necesare şi metode speciale de pregătire a preparatelor.

Tehnici de lucru în microscopia fotonică

Preparatul citologic sau histologic poate fi permanent (durabil) sau nepermanent (temporar, vremelnic). În primul caz el conţine celule în prealabil omorâte şi colorate, în al doilea caz celulele pot fi vii sau să se afle în stare de paranecroză. Astfel de preparate trebuie studiate imediat după pregătirea lor. Preparatele permanente se păstrează ani de zile.

Atât preparatele permanente, cât şi cele nepermanente se pregătesc pe lame de sticlă şi se acoperă cu lamele groase de 0,17-0,20 mm, după care se pot privi structurile atât la măritoarele slabe cât şi la cele puternice ale microscopului.

Cele mai răspândite metode de pregătire a preparatelor permanente includ câteva etape de prelucrare a obiectelor, cum ar fi: fixarea celulelor deshidradate, spălarea şi includerea în parafină. Apoi, fragmentul de ţesut impregnat cu parafină se fixează pe stativul microtomului (dispozitiv pentru obţinerea secţiunilor subţiri), se execută secţiuni prin obiecte, se lipesc pe lame de sticlă, apoi din secţiuni se îndepărtează parafina, se colorează, din nou se deshidratează şi se includ sub lamelă într-o picătură de balsam de Canada. Un astfel de preparat permanent este transparent şi poate fi privit la microscopul fotonic.

Să prezentăm mai detaliat toate etapele menţionate de realizare a preparatului permanent.

1. Fixarea celulelor şi ţesuturilor

În vederea obţinerii preparatului permanent ţesutul trebuie să fie repede omorât, pentru a preîntâmpina procesele de autoliză şi de heteroliză a celulelor. Substanţa care fixează (fixatorul), omorând celulele, trebuie să păstreze într-o măsură maximă structura din timpul vieţii. Altfel vorbind, astfel de fixatori "ideali" care păstrează în totalitate structura nativă a celulelor, nu pot exista, deoarece omorând celulele, ei sunt însoţiţi de modificări importante ale proteinelor, de dizolvarea unei părţi a materialului celular, de precipitarea unor substanţe din

Scanned with OKEN Scanner

soluţie etc. Totuşi, anumiţi fixatori modifică uşor structura celulei; asemenea substanţe sunt considerate bune medii fixatoare.

Fixarea este necesară nu numai pentru a omorî ţesutul. Este important, de asemenea, să precipite şi să lege substanţele şi structurile care există în celulă, făcându-le inaccesibile pentru extragerea sau distrugerea în timpul prelucrării ulterioare a ţesutului. Fixatorul trebuie să mărească capacitatea structurilor de a percepe coloranţii histologici şi de a ridica diferenţa în indicii de refracţie a componentelor celulare, ceea ce dă posibilitatea de a observa ţesuturile fixate şi fără colorare.

Cel mai adesea se utilizează fixatori în amestec, care conţin alcool, formalină, clorură mercurică (sublimat coroziv), acizi: cromic, picric, acetic, tetraoxid de osmiu. În funcţie de scopul cercetării se folosesc diferite amestecuri fixatoare, în măsura în care în timpul diferitelor fixări, în celule se păstrează diferite substanţe.

Să analizăm particularităţile diferitelor substanţe care intră în alcătuirea amestecurilor fixatoare şi destinaţia lor în compoziţia fixatorilor:

Formalina. Formalina din comerţ reprezintă o soluţie apoasă 40 % de formaldehidă (substanţă în stare gazoasă). O asemenea formalină se consideră 100 %. Pentru fixare formalina se foloseşte fie în alcătuirea amestecurilor fixatoare compuse, fie se utilizează 7-20 % soluţie de formalină comercială, pregătită în apă curgătoare (de robinet). În formalina comercială totdeauna există urme de acid formic, care acţionează nefavorabil asupra ţesutului fixat. Pentru a scăpa de el, formalina se neutralizează, în care scop pe fundul borcanului cu formalină de cercetat se pune un strat de 1-2 cm de carbonat de calciu sau de magneziu.

Formalina are un miros pătrunzător, provoacă nu rareori lăcrimare, irită mucoasele căilor respiratorii. De aceea, când se lucrează cu formalină trebuie atenţie; transvazarea ei se recomandă a se face sub nişă.

Formalina pătrunde repede în obiect. Durata de fixare este de la o oră la câteva zile şi chiar luni (în formalină de 7-10 % obiectul nu se alterează la o păstrare îndelungată). Asemenea însuşiri ale formalinei o fac de neînlocuit în condiţii de expediţie. După fixare cu formalină este necesară o spălare minuţioasă a fragmentului de ţesut cu apă curgătoare (de robinet). Timpul de spălare trebuie să fie apropiat de durata de fixare, totuşi o spălare mai îndelungată de 24 de ore (chiar la o fixare îndelungată) nu se recomandă.

Formalina se întrebuinţează pentru fixarea celulelor în timpul studierii morfologiei lor generale, ca şi pentru păstrarea şi pentru evidenţierea ulterioară în celule a grăsimilor. Pentru aceasta trebuie avut în vedere că în timpul păstrării îndelungate a obiectelor în formalină se poate produce distrugerea unei

Scanned with OKEN Scanner

părţi din lipide sub acţiunea lipazelor, a căror activitate în formalină nu dispare complet. După fixarea cu formalină, în celule se păstrează glicogenul, care poate fi evidenţiat printr-o reacţie histochimică ulterioară. Se consideră că formalina se combină cu aminoacizii, neutralizând-le grupele bazice. În legătură cu aceasta proteinele încep să manifeste o afinitate mai mare faţă de.coloranţii bazici, decât în cazul altor fixări, şi încep mai tare să se coloreze cu coloranţi acizi. Unele obiecte, de exemplu frotiurile puţin uscate de protozoare, se pot fixa cu vapori dc formalină nediluată. În unele cazuri (de ex. metodele speciale de suflare în argint a ţesutului nervos) se foloseşte formalina nu de 10%, ci de 20%, iar pentru fixarea nevertebratelor marine se foloseşte adesea formalina de 7%, diluată în apă marină. Pentru păstrarea animalelor nevertebrate fixate, nu rareori se aplică soluţie 4-5% de fixator.

Foarte adesea formalina se foloseşte ca unul din componenţii amestecurilor fixatoare compuse. De exemplu, amestecurile *formalină-alcool, acid acetic; calciu-formol; fixatorul Şabadaşa* ş.a.

Clorura mercurică. De obicei nu se foloseşte pentru fixarea ca atare (în stare pură), ci în componenţa amestecurilor fixatoare compuse. Ea pătrunde repede în ţesut, comprimă puţin obiectul, dar precipită destul de brutal proteinele.

Clorura mercurică este un toxic puternic, de aceea cu ea trebuie să se lucreze cu foarte multă atenţie. Pentru îndepărtarea clorurii mercurice din ţesuturi în vederea colorării ulterioare a obiectului este necesară spălarea fragmentului de ţesut cu apă curgătoare şi imersarea obiectului în alcool 70%, cu adăugarea în mediu a iodului şi iodurii de potasiu. Pentru pregătirea soluţiei de iod cu iodură de potasiu se dizolvă 2 g iod şi 3 g iodură de potasiu în 100 ml alcool 90 %. Această soluţie trebuie să se adauge cu picătura într-un pahar cu alcool 70 % până la dobândirea de către el a culorii unui ceai puternic. Fragmentele de ţesut, fixate cu clorură mercurică, trebuie păstrate în alcool cu iod până atunci când soluţia nu devine saturată. De obicei în alcool cu iod materialul se spală timp de 4-5 ore, chiar până la 24 de ore în unele cazuri. O spălare mai îndelungată nu se recomandă, deoarece iodura de potasiu poate determina dizolvarea unor substanţe fixate în celulă. Cel mai utilizat fixator cloro-mercuric este amestecul *Tzenker.*

Etanolul. Alcoolul etilic (etanolul), se utilizează rar pentru fixare în stare pură, deoarece el zbârceşte puternic şi face compact ţesutul, denaturează proteinele. Glicogenul se precipită cu alcool etilic, iar grăsimile se dizolvă. Alcoolul pătrunde repede în ţesut, scoţând apa.

Cel mai răspând^At fixator ce conţine alcool este amestecul *Carnoy.*

Tetraoxidul de osmiu (impropriu numit acid osmic). Se utilizează ca fixator în soluţie de 1-2 %, pregătit în apă bidistilată sau în tampon fosfatic la ph 7-7,4. Uneori se utilizează ca fixator vaporii de tetraoxid de osmiu. Pentru îndepărtarea fixatorului se utilizează un vas spălat cu grijă deosebită. Fixatorul se păstrează la întuneric, într-un vas bine închis şi în frigider. Vaporii de tetraoxid de osmiu irită mucoasele, de aceea se recomandă a pregăti şi transvaza fixatorul sub nişă. Tetraoxidul de osmiu este

Scanned with OKEN Scanner

unul din cei mai buni fixatori pentru cercetările de citologie, deoarece el păstrează bine structura fină a celulei. Este unul din fixatorii principali şi pentru microscopia electronică. Dacă se închide la culoare sau în el au căzut sedimente (a precipitat) nu se mai poate întrebuinţa pentru fixare. Urmează a avea în vedere că tetraoxidul de osmiu pătrunde încet în ţesut, de aceea fragmentele de ţesut trebuie tăiate în porţiuni mici înainte de imersarea lor în fixator. Diametrul lor nu trebuie să depăşească 2 mm (pentru microscopia fotonică) şi 0,5-1 mm (pentru microscopia electronică).

În timpul folosirii oricărui fixator este necesar să se respecte următoarele reguli: să se imerseze repede obiectul în amestecul fixator; volumul fixatorului trebuie să fie mai mare de 50-100 ori decât volumul fragmentului de ţesut; fixarea trebuie să se facă în vas bine închis; dacă ţesutul este bogat în apă sau în sânge, lichidul care fixează urmează să se schimbe de două ori. Atât până la, cât şi după fixare, obiectul nu trebuie să se usuce în aer. Excepţie fac frotiurile şi amprentele (urmele), care după preparare se usucă pentru scurtă vreme în aer şi abia apoi se fixează. Frotiurile colorate se pot usca puţin şi privi la microscop fără lamelă într-o picătură de ulei de cedru sau se includ, sub lamelă, în balsam de Canada.

După o scurtă caracterizare a substanţelor de bază, folosite pentru fixarea ţesuturilor, vom face cunoştinţă cu câteva din cele mai răspândite reţete de fixatori. Prin folosirea acestor lichide fixatoare au fost pregătite preparatele principale a căror descriere este dată în acest manual de lucrări practice.

Formalină 10%. Fixator larg folosit pentru scopuri morfologice şi histochimice. La 1 parte formalină neutră (din comerţ) se adaugă 9 părţi de apă curgătoare. Durata de fixare: nu mai puţin de o oră. Se poate ţine materialul în fixator câteva zile. Fragmentele de ţesuturi pot fi mari. După fixare se spală cu apă curgătoare timp de 6-24 ore (în funcţie de timpul de fixare şi de mărimea fragmentului).

Calciu-formol. Fixatorul se întrebuinţează atât pentru scopuri de citologie generală, cât şi pentru reacţiile histochimice asupra fosfatazei acide (şi o serie de alte enzime). Durata de fixare: 18-24 ore. Pentru reacţia asupra fosfatazei acide fixarea se face la rece. După fixare obiectele se spală în apă curgătoare timp de 24 ore.

Compoziţia fixatorului: clorură de calciu - 10 ml; formalină neutră (din comerţ) - 10 ml; apă distilată - 80 ml.

Formalină-alcool etilic-acid acetic. Fixatorul se întrebuinţează în principal pentru determinările cantitative ulterioare ale acizilor nucleici pe preparate cu reacţiile histochimice realizate pe ele asupra ARN-ului şi ADN-ului. Durata de fixare: 3-4 ore după care urmează spălarea fragmentelor cu apă curgătoare timp de 12-18 ore.

Compoziţia fixatorului: formalină neutră (din comerţ) - 3 părţi; alcool etilic 96% - 1 parte; acid acetic glacial - 0,5 părţi. Pentru păstrarea conţinutului în acizi nucleici după fixare se recomandă o trecere rapidă în alcool şi o introducere în parafină.

Fixatorul Şabadaşa. Se foloseşte în special pentru evidenţierea histochimică a glicogenului şi a

Scanned with OKEN Scanner

mucopolizaharidelor neutre. Fixatorul reprezintă două amestecuri. În primul din ele se imersează mici fragmente de ţesuturi, timp de 30-60 minute (uneori până la 24 ore), iar în al doilea - timp de 6-24 ore. După fixare fragmentele se clătesc în alcool 96 % şi se trec 1-3 ore în alcool absolut, iar apoi în medii intermediare până la parafină. Trecerea trebuie făcută rapid.

Compoziţia fixatorului: *Amestecul I*: alcool etilic 96% -100 ml; azotat de cupru - 1,8 g; azotat de calciu - 0,9 g; formalină comercială - 10 ml (se adaugă înainte de întrebuinţare).

Amestecul II: alcool 96 % - 100 ml; azotat de calciu - 2,6 g; formalină comercială - 10 ml (se adaugă înainte de întrebuinţare).

Adăugarea la primul amestec a azotatului de cupru este necesară pentru inhibarea acţiunii enzimelor glicolitice. Fixatorul compactizează puternic ţesuturile, de aceea pentru a uşura secţionarea ulterioară a materialului se recomandă a fixa fragmente mici de ţesuturi.

Fixatorul Tzenker. Se întrebuinţează pentru scopuri de citologie generală. Durata de fixare: 2-24 ore. După fixare trebuie o spălare îndelungată a fragmentelor în apă curgătoare (până la 24 ore) şi ţinerea în soluţie alcoolică (70 %) de iod în iodură de potasiu (pentru îndepărtarea resturilor de clorură mercurică).

Compoziţia fixatorului: clorură mercurică - 5 g; bicromat de potasiu -2,5 g; sulfat de sodiu - 1g; apă distilată - 100 ml. Înainte de utilizare, în 100 ml amestec se adaugă 5 ml acid acetic glacial. De obicei, în laboratoare se pregăteşte o dată un mare volum din soluţia de bază (fără acid acetic), care se poate păstra vreme îndelungată în vas închis şi în loc întunecat. Se poate, în 100 ml soluţie de bază, înainte de întrebuinţare, adăuga 5 ml formalină comercială (modificarea lui Helli).

Fixatorul Carnoy. Se poate întrebuinţa atât pentru studiul morfologic general al celulelor şi ţesuturilor, cât şi pentru o serie de reacţii histochimice. Fixatorul este bun pentru că pătrunde repede în ţesut şi nu necesită o spălare ulterioară cu apă. Fragmentele, din fixator, se trec direct în alcool 96% pentru câteva minute şi apoi în alcool 100%. Durata prelucrării ulterioare a fragmentelor de ţesut depinde de scopul urmărit de cercetător: dacă secţiunile se preconizează a fi folosite pentru reacţii histochimice (de ex. pentru acizi nucleici), conducerea materialului până la parafină trebuie făcută rapid.

Compoziţia fixatorului: alcool etilic de 96 sau 100% - 6 ml; cloroform - 3 ml; acid acetic glacial - 1 ml. Durata de fixare: în funcţie de mărimea fragmentelor şi de compacitatea ţesutului: de la 20 la 90 minute.

Fixatorul Navaşin. Se foloseşte deosebit de des pentru fixarea obiectelor vegetale. El pătrunde repede în ţesuturi, le conservă şi le face compacte. Acidul cromic, care intră în compoziţia fixatorului, mordansează ţesuturile, îmbunătăţind colorarea ulterioară. Adesea, fixatorul se foloseşte pentru scopuri cariologice, deoarece el păstrează bine structura cromozomilor. Durata de fixare: 12-24 ore, urmează spălarea cu apă curgătoare (de robinet) timp de 12-24 ore.

Scanned with OKEN Scanner

Compoziţia fixatorului: acid acetic glacial - 1 parte; formalină 40% - 4 părţi; acid cromic 1% - 10 părţi.

Fixatorul Leviţkii. Se întrebuinţează, adesea, pentru cercetarea celulelor vegetale. Prin folosirea lui în celule se păstrează mitocondriile, care se distrug sub acţiunea acidului acetic glacial, ce intră în fixatorul Navaşin. Obiectele se imersează succesiv în două amestecuri.

Compoziţia fixatorului: Amestecul I: acid cromic 1% - 3 părţi; formalină 10% - 17 părţi; durata de fixare: 48 ore; Amestecul II: acid cromic 1% - 15 părţi; acid osmic 2% - 2 părţi; apă distilată - 18 părţi; durata de fixare: 7 zile.

După fixare trebuie o spălare minuţioasă a materialului în apă curgătoare timp de 24 ore.

Fixatorul Buen. Se foloseşte pentru diferite scopuri şi dă bune rezultate. Cu deosebit succes se fixează cu el epiteliile şi glandele. Nu se recomandă a-l întrebuinţa pentru punerea în evidenţă a acizilor nucleici.

Compoziţia fixatorului: soluţie apoasă saturată de acid picric - 16 părţi; formalină nedizolvată - 5 părţi; acid acetic - 1 parte.

Durata de fixare: de la 2 ore la câteva zile. Un mare avantaj al acestui fixator constă în faptul că obiectul se poate păstra în el cu săptămânile şi chiar cu lunile, ceea ce este favorabil pentru aplicarea lui în condiţii expediţionare. Totuşi, materialul se păstrează mai bine în acest amestec fără adăugarea în el a acidului acetic. După fixare, fragmentele de ţesut se spală în alcool 70-80 %, schimbându-l de 3-4 ori. După fixarea cu amestecul Buen nu se recomandă a colora ţesuturile cu hematoxilină ferică, deoarece secţiunile dobândesc o nuanţă roşiatică. Alţi coloranţi dau rezultate bune.

Fixatorul Şampi. Dă rezultate remarcabile în studierea mitocondriilor şi aparatului Golgi.

Compoziţia fixatorului: acid cromic 1% - 7 ml; bicromat de potasiu 3% - 7 ml; acid osmic 2 % - 1 ml. Pentru studierea ulterioară a mitocondriilor, fragmentele mici de ţesut, după fixare timp de 24 de ore, se spală cu apă distilată timp de 30 minute şi se pun pentru 24 ore în amestecul de acid cromic 1% cu adăugarea unei părţi de acid acetic pyrolignosum. Se spală timp de 30 minute şi se pun pentru 3 zile în soluţie 3% de bicromat de potasiu.

Apoi se spală timp de 24 de ore în apă curgătoare. Pentru evidenţierea aparatului Golgi, această fixare se foloseşte în varianta Nasonov.

Aldehida glutarică. De obicei se întrebuinţează în microscopia electronică şi dă o integritate remarcabilă a ţesuturilor, însă cu succes se foloseşte şi pentru obţinerea secţiunilor obişnuite, deci pentru microscopia fotonică. Aldehida glutarică se foloseşte în soluţie de tampon fosfat cu pH 7,2. De obicei, se folosesc 2-2,5 % sau 5% soluţie (glutaraldehida din comerţ este o soluţie 25%).

Scanned with OKEN Scanner

2. Deshidratarea materialului şi includerea lui în parafină

Pentru a executa secţiuni subţiri prin ţesuturile animale şi vegetale, ele trebuie să fie, după fixare (iar într-o serie de cazuri după spălare), prelucrate cu o serie de substanţe care se amestecă reciproc şi care la început deshidratează ţesuturile, iar apoi asigură impregnarea cu parafină. Materialul, impregnat cu parafină este plastic şi din el se pot tăia secţiuni subţiri.

Procedurile ulterioare ale deshidratării, impregnării cu solvenţii parafinei şi inclusiv cu parafină poartă numele de "împarafinare". Cea mai simplă metodă implică plasarea materialului, după fixatorul pe bază de apă, într-un vas cu apă distilată, apoi succesiv în alcool etilic de 70%, 96%, 100%. Prin aceste proceduri se asigură deshidratarea ţesutului. Apoi obiectul trece în amestec de alcool 100 % şi toluen (xilol sau cloroform), apoi în toluen pur (xilol, cloroform sau solvenţi ai parafinei). În toluen obiectul devine semitransparent, cu aspect sticlos. După clarificare fragmentele de ţesut se trec în amestec de toluen cu parafină. Acest amestec se încălzeşte în prealabil în termostat până la 37° şi devine lichid. Din amestec, care se păstrează la 37°, obiectul se scufundă în parafină topită la 56°, iar apoi se trece într-o sticlă de ceas, în care se pune parafină topită şi se adaugă ceară de albine 10%. Sticla de ceas se răceşte repede şi fragmentele de ţesut devin îmbibate cu parafină. Din parafina solidificată se taie cuburi ce conţin în ele obiectul. Cuburile se lipesc pe suporturi metalice sau de lemn şi se fixează pe dispozitivul microtomului pentru pregătirea secţiunilor de grosime necesară.

2.1. Deshidratarea şi impregnarea cu solvenţi ai parafinei

De minuţiozitatea deshidratării materialului depinde calitatea preparatului, obiectul insuficient deshidratat nu se va impregna cu parafină, deoarece apa nu se amestecă cu parafina, iar din secţiune se vor colora porţiuni de ţesut neîmbibat. O deshidratare prea îndelungată, de asemenea, este neeficace, menţinerea vreme îndelungată în alcool de concentraţie mare compactizează materialul, îngreunează impregnarea lui cu parafină. Pe cale experimentală este stabilită durata optimă a împarafinării. Pentru diferite ţesuturi şi pentru fragmente de diferite mărimi durata de pregătire pentru împarafinare poate să difere în măsură însemnată şi cercetătorul trebuie să potrivească cel mai bun timp de deshidratare pentru obiectul studiat, înainte de a începe turnarea în masă a materialului.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru muguri se pot propune două variante de deshidratare a materialului: rapidă şi îndelungată. Prima necesită o fixare prealabilă a micilor fragmente de ţesut (2-2,5 mm). În fiecare din alcooli (70%, 96%, 100%) obiectul se ţine 2 ore; în amestecul de alcool 100 % cu toluen (1:1) - 30 minute, în două schimburi de toluen câte 15 minute în fiecare; în parafină şi toluen - 3 ore, şi în două schimburi de parafină până la 40 minute.

Dacă nu există posibilitatea de a fixa şi deshidrata materialul după o zi (nu în aceeaşi zi), se poate prelungi operaţia, păstrându-l în medii nevătămătoare pentru obiect până în ziua următoare. Un astfel de mediu poate fi alcoolul etilic 70 % (în el materialul se poate păstra cu săptămânile). Mai puţin favorabilă este menţinerea obiectelor în alcool 96% sau 100 %, deşi uneori este admisibil. Materialul nu poate rămâne însă în toluen sau amestec de toluen cu alcool; aceste medii usucă puternic materialul, îl fac casant, greu de secţionat. Materialul poate rămâne în amestecul toluen cu parafină timp de 12 - 18 ore. Dacă se întăreşte puternic, se recomandă a-l scoate pentru o noapte din termostat; în felul acesta amestecul toluen - parafină dobândeşte o consistenţă semilichidă.

În timpul folosirii unei operaţii îndelungate, dupa fixare materialul se trece în alcool 70 %, până în următoarea dimineaţă, apoi în alcool 96 % timp de 5-7 ore, apoi în alcool 100 % o noapte. În amestecul de alcool cu toluen şi în toluen pur materialul urmează să rămână tot atât timp cât şi în varianta rapidă. În amestecul toluen cu parafină, fragmentele se ţin timp de 4 - 6 ore (chiar o noapte), iar în 2 schimburi de parafină câte 40 - 50 minute.

Pentru materialul embrionar se foloseşte operaţia scurtă, începând de la alcool de 50 %, pentru ca să creeze o mare gradare a procesului de deshidratare şi să se îndepărteze acţiunea dăunătoare a curenţilor de difuziune ai lichidului asupra ţesutului. În acest scop se foloseşte, de asemenea, nu un amestec de toluen cu alcool 100 % ci două amestecuri: **1)** 1 parte toluen + 2 părţi alcool; **2)** 2 părţi toluen + 1 parte alcool.

Uneori se foloseşte amestec de toluen cu cloroform, apoi acestea şi parafină.

Pentru ţesuturi delicate, bogate în apă (de ex. rădăcinile) se recomandă a se începe operaţia cu alcool 10 %, mărind treptat concentraţia acestuia: 20%, 30%, 40%...până la 100 %. În alcooli de concentraţii mici obiectul trebuie ţinut până la 15 minute; începând cu cel de 50 % până la 30 minute, iar în cei de 70%-100 %, câte o oră în fiecare. Cel de 100% se schimbă de 2 ori, iar apoi urmează 3 amestecuri de alcool şi solventul parafinei, crescând treptat concentraţia solvenţilor. Apoi obiectele se trec în toluen sau cloroform pur, în care se adaugă mici fragmente de parafină. Creuzetele cu obiecte se acoperă cu căpăcele la început, iar când

Scanned with OKEN Scanner

parafina care s-a topit a impregnat obiectul, căpăcelul se ia şi ţesutul rămâne în vas deschis timp de 2 - 4 zile până la evaporarea completă din creuzet a solventului parafinei. Eliberată de solvent, parafina împreună cu obiectele se toarnă în cutii (cadre, capsule) mici pregătite dinainte, unde parafina se răceşte (solidifică) rapid.

2.2. Impregnarea cu parafină şi includerea în parafină

Materialul, ţinut mai multe ceasuri în masa de parafină la 37°, trebuie să fie trecut în parafină topită la 56°. Vasul cu parafină topită se poate păstra în permanenţă în termostat.

Cu cât se ţine parafina mai mult în termostat, cu atât ea devine mai plastică şi materialul imersat în ea se secţionează mai bine. Fragmentele de ţesut se ţin în două amestecuri de parafină timp de câte 40 - 60 minute în fiecare. Trecerea fragmentelor dintr-un creuzet cu parafină în altul trebuie să se facă cu penseta încălzită.

Din al doilea schimb de parafină, fragmentele de ţesut se scufundă în parafină fierbinte, în care în prealabil s-a adaugat 10% ceară. Această procedură are loc pe masa de lucru în apropierea termostatului. Amestecul de parafină cu ceară se toarnă în sticle de ceas adânci (sau în forme speciale de metal), unse cu glicerină, şi în el repede se coboară obiectele. La partea de jos sticlele de ceas se răcesc repede cu apă rece existentă în cristalizoare largi. Când parafina de la suprafaţă s-a răcit, sticla de ceas cu fragmentele incluse în parafină se scufundă în apă până la completa solidificare a parafinei. Discul de parafină cu obiectele incluse în el, se separă uşor de sticla de ceas unsă cu glicerină. Apoi, obiectul cu o mică cantitate de parafină din jur se taie în formă de cub, care se lipeşte cu parafină topită de suportul de lemn, adesea numit "bloc", cubul de parafină, adesea numit "bloc", cu obiectul şi suportul de lemn, se răcesc o anumită vreme în apă rece pentru o fixare mai sigură a cubului de parafină de suport. Apoi se fasonează pereţii cubului cu briciul, aşa încât pereţii opuşi să fie paraleli; în caz contrar, la secţionarea materialului nu se va obţine o bandă uniformă cu secţiuni. Uneori materialul se pune nu în sticle de ceas, ci în cutii din calc sau hârtie tare (densă) pregătite dinainte sau în cadre metalice speciale.

3. Executarea secţiunilor la microtom

Microtomul serveşte pentru executarea secţiunilor prin material inclus în parafină sau celoidină. Există şi microtoame de congelare şi criostate, cu ajutorul cărora se fac secţiuni prin

Scanned with OKEN Scanner

țesuturi congelate (nu incluse în parafină).

Microtoamele, la care au fost obținute secțiuni prin majoritatea țesuturilor, luate în considerație în practica citologică și în manualul nostru, sunt de două feluri: la unele din ele cuțitele (bricele) pentru executarea secțiunilor sunt fixate imobil și cu ajutorul sistemului de aducere obiectul se mișcă pe cuțit; la alte microtoame (cu sanie, glisante) cuțitul se mișcă pe o șină în întâmpinarea blocului, care la rândul său se ridică cu un anumit număr de microni în sus. În ambele cazuri se pot obține secțiuni de o anumită grosime, dinainte stabilită, ce permit a fi cercetate în lumina care le străbate.

Fără a ne opri în detaliu asupra alcătuirii microtoamelor, observăm numai că mânuirea acestui aparat trebuie făcută cu acurateţe. Microtomul trebuie în permanență uns și ținut în curățenie. Pentru obținerea de secțiuni plane trebuie să avem un brici de microtom bine ascuțit și îndreptat. Foarte important este, de asemenea, ca în timpul lucrului la microtom toate șuruburile care fixează briciul și obiectul să fie bine fixate și să fie corect potrivit unghiul de înclinare a briciului față de obiect.

În timpul obținerii secțiunilor nu rareori apar dificultăți legate de o serie de cauze, la care ne vom referi în continuare.

Dacă cuțitul (briciul) microtomului este prost fixat, secțiunile pot avea grosime diferită. Prin prezența știrbirilor (zimțăturilor) pe suprafața briciului, secțiunile pot fi zgâriate, și adesea se dezagregă în cursul mișcării briciului, astfel încât un atare brici trebuie să fie îndreptat sau ascuțit. Unghiul de înclinare a briciului față de blocul de parafină determină într-o măsură însemnată calitatea secțiunilor. Acest unghi este de aproximativ 15^0, dar în funcție de duritatea parafinei, de temperatura camerei în care se lucrează și de compacitatea obiectului inclus în parafină, adesea apare necesitatea de a modifica unghiul de înclinare a briciului pentru a asigura obținerea unei benzi plane cu secțiuni, fără zbârcituri și răsucituri. Duritatea parafinei, în care este inclus obiectul, se modifică puternic în funcție de temperatură. La o temperatură mai mare de 20 - 22^0 secțiunile de parafină încep să sară și să se apropie de bloc după instalarea bruscă a frigului sau în procesul de obținere a secțiunilor se apropie de bloc bucăți de gheață sau de vată umectate cu apă foarte rece. În cameră rece, dimpotrivă, secțiunile se pot fărâmița și nu se realizează o unică bandă de secțiuni. În acest caz se poate apropia de microtom o lampă de birou și prin aceasta, se încălzește ușor blocul de parafină. Foarte important în timpul executării secțiunilor este să urmărim o sarcină obligatorie: a deplasa briciul (sau blocul) foarte repede sau moderat, dar și uniform.

Scanned with OKEN Scanner

Panglica cu secţiuni se pune pe lama de sticlă, în prealabil unsă cu proteină (albuş de ou) filtrată prin hârtie de filtru (în care se adaugă tot atâta glicerină şi un cristal de timol antiseptic) (Fig. 10).

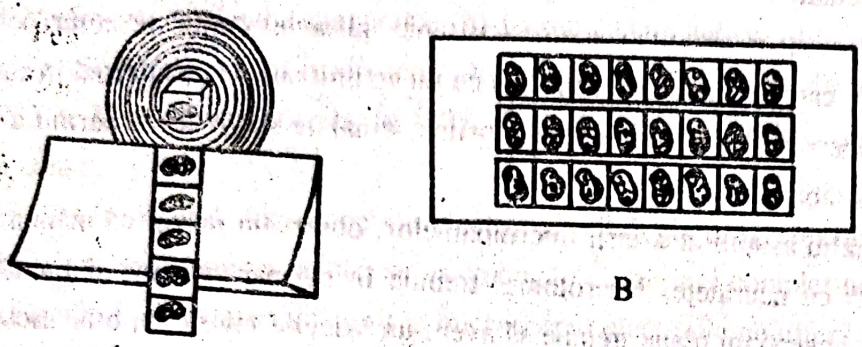


Fig. 10: Bandă de secţiuni seriate: incluse în parafină (A), etalate pe lama port-obiect (B) (d. Cotrutz şi colab.)

Stratul de albumină se usucă repede pe lama de sticlă. Se poate ţine lama unsă cu albumină timp de 10 minute în termostat la 37°C. Pe o asemenea lamă se pun câteva picături de apă peste panglica de parafină cu secţiuni. Se încălzeşte uşor lama pentru întinderea panglicii de parafină, fără topirea acesteia.

Lamele cu secţiunile în parafină astfel etalate trebuie păstrate la loc curat, iar o vreme se ţin chiar în termostat la 37° (20-30 min.), pentru ca secţiunile să se fixeze bine de lamă

4. Deparafinarea secţiunilor

Pentru a se putea trece la colorare, din secţiuni trebuie îndepărtată parafina. Aceasta se realizează prin introducerea lamelor în pahare cu toluen (xilol, benzen) timp de 3 - 4 minute. Apoi lamele cu secţiuni se trec treptat în pahare cu alcool etilic de concentraţii descrescânde (100%, 96%, 70%) şi mai departe în apă distilată (această operaţie depinde şi de felul colorantului, şi de dizolvantul lui: alcool sau apă).

5. Colorarea secţiunilor

Coloranţii histologici interacţionează cu structurile tisulare în mod diferit: unii din ei formează legături covalente (aşa se formează combinaţiile de săruri ale coloranţilor acizi cu grupele bazice ale proteinelor celulare şi cu alte substanţe sau ale coloranţilor bazici cu radicalii acizi ai proteinelor, acizilor nucleici ş.a); în alte cazuri structurile celulare se impregnează cu

Scanned with OKEN Scanner

colorantul; în acest caz o importanţă hotărâtoare o au însuşirile fizico-chimice ale colorantului şi ale substratului; uneori colorantul se depune pe suprafaţa structurii, iar în unele cazuri se dizovă în incluziunile celulare. Aşa se întâmplă în cazul colorării substanţelor grase cu colorantul Sudan III. În majoritatea cazurilor colorarea ţesuturilor se realizează atât pe seama impregnării substratului cu colorant, cât şi pe seama combinării lui durabile cu radicalii activi ai celulei, formându-se o nouă substanţă - produsul reacţiei. Unele metode de colorare se bazează pe folosirea metalelor bivalente sau trivalente şi a coloranţilor (mai adesea o-difenolilor), capabili să formeze un complex cu ionul de metal. Ionul de metal, la rândul său, se leagă de componentele ţesutului. Unul din cei mai răspândiţi coloranţi în citologie şi histologie - hematoxilina, este un exemplu de colorant mordant. Înainte de colorare cu hematoxilină sau în procesul acestei colorări se foloseşte ca mordant alaunul de potasiu sau de fier.

Toţi coloranţii pot fi împărţiţi în două mari grupe în funcţie de care anume structură cu precădere se colorează: nucleul sau citoplasma.

Coloranţii nucleari, la rândul lor, se împart în 2 grupe:

a) bazici sau "cationici", care formează cu acizii nucleici şi cu proteinele acide ale nucleului combinaţii sub formă de săruri. În această categorie intră azur A şi B, albastru de toluidină, albastru de metil, safranină, verde metil, tionină, fluorocromi s.a.

b) acizi sau de mordansare: hematoxilină, carmin, alizarină, halocianină ş.a.

Coloranţii citoplasmatici. În principal, reprezintă acizi carbonici sau sulfonici, care în ţesuturi se leagă de proteinele de bază ale citoplasmei, ce conţin arginină, lizină, oxilizină, histadină. În această categorie intră nitrocoloranţii, de exemplu acidul picric, care pe lângă citoplasmă, colorează fibrele de colagen. În aceeaşi categorie intră şi eozina J şi B, eritrozina, floxina, fuxina acidă, verde lumină s.a. De obicei, pentru colorarea ţesuturilor se folosesc amestecuri de diferiţi coloranţi, datorită cărora se colorează selectiv diferite structuri celulare. Astfel, la colorarea cu hematoxilină şi eozină, nucleul percepe cu precădere hematoxilina şi se colorează în albastru-violet, iar citoplasma dobândeşte o culoare roz, legându-se prin radicalii săi bazici de eozină (colorant acid). Larg se foloseşte (îndeosebi pentru colorarea hematiilor) amestecul de azur şi eozină. Azurul, viitorul colorant bazic, colorează componentele acide ale celulei, mai întâi de toate acizii nucleici şi proteinele acide iar eozina - proteinele citoplasmatice bazice. Bazifilia este afinitatea structurii celulare faţă de colorantul bazic.

Scanned with OKEN Scanner

Bazifiliei, prin urmare, i se supun componentele acide ale celulei. Oxifilia (acidifilia) este afinitatea faţă de coloranţi acizi. Oxifile (acidifile) sunt componentele alcaline ale celulei.

Uneori pentru colorare se potriveşte un amestec de coloranţi cu grad diferit de dispersie. În acest caz selectivitatea colorării se determină prin mărimea particulelor de colorant şi prin dimensiunile suprafeţelor intermicelare şi compacitatea structurii. În timpul colorării Mallori (metoda Mallorii) se folosesc fuxină acidă, albastru de anilină şi oranj J. Colorantul puternic dispersat - oranjul J şi fuxina pătrund în cele mai compacte structuri, îndeosebi în nucleu, iar particulele mari de albastru de anilină nu pătrund în nucleu, însă colorează bine fibrele de colagen şi mucilagiul.

Pentru a evidenţia în celulă anumite substanţe chimicc (de ex. acizi nucleici, lipide, glicogen, proteine sau anumite grupe reactive ale acestora, ca şi enzime, vitamine şi alte substanţe, este necesară efectuarea unor reacţii histochimice speciale, prin care aceste substanţe (sau produsele reacţiei lor) se colorează selectiv. Într-o serie de cazuri, pentru evidenţierea anumitor substanţe chimice în celulă se ajunge la folosirea unor procedee suplimentare de control a preparatelor, de exemplu prin dizolvarea sau prin blocarea substanţelor sau a anumitor grupe reactive.

6. Montarea secţiunilor sub lamelă

Majoritatea coloranţilor folosiţi în citologie reprezintă soluţii apoase. Pentru a obţine preparatul permanent este necesar a acoperi secţiunile cu lamela, montându-le într-un mediu transparent ce se solidifică, cu indicele de refracţie apropiat de acela al sticlei. Se poate, clătind secţiunile cu apă distilată, picura pe ele o soluţie încălzită de gelatină. Dar o mai bună păstrare şi cele mai bune calităţi ale preparatelor se obţin incluzându-le în balsam de Canada. Deoarece balsamul de Canada nu este miscibil cu apa, ci cu un dizolvant organic (toluen, xilol, benzen), atunci preparatul se trece din apă printr-o serie de alcooli până la dizolvantul balsamului de Canada. Trebuie amintit că prezenţa unei neînsemnate cantităţi de apă formează un preparat impropriu pentru cercetare. De aceea, trecerea secţiunilor de la apă la toluen se face treptat, până la alcool absolut (apoi în amestec de alcool toluen), iar în cele din urmă în toluen pur, timp de 2-3 minute. Se poate lucra după schema:

Schema: apă distilată - clătire; alcool 70 % - 2 minute; alcool 96 % - 2 minute; alcool 100 % - 3 minute; toluen I - 2 minute; toluen II - 3 - 5 minute.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru ca secţiunile să se includă sub lamelă, este necesar ca, nespălând colorantul, să se obţină o drenare completă a acestora. Se atinge acest scop prin pilotarea în alcooli de concentraţie crescândă.

Tehnici de lucru în microscopia electronică cu transmisie

1. Prelevarea probelor

Intervenţia experimentatorului asupra materialului biologic poate să producă modificări notabile la nivel ultrastructural şi chiar apariţia de artefacte. Din acest motiv, timpul scurs între recoltarea unui fragment de organ sau ţesut şi fixarea acestuia trebuie să ie cât mai scurt. O altă condiţie esenţială obţinerii unor rezultate corecte este ca probele de material biologic să fie prelevate numai de la organisme vii care nu au suferit acţiunea unor factori stresanţi din mediul în care au crescut. Se recomandă chiar, ca odată cu prelevarea pieselor de ţesut să se realizeze şi o prefixare "in vivo" a materialului respectiv.

Cu ajutorul unei lame de ras noi, bine degresate, prin mişcări de translaţie se confecţionează piese mici, cubice, cu latura de 1 mm. Probele recoltate se introduc, cu ajutorul unor scobitori, într-un flacon cu fixator răcit la $+4^0C$.

2. Fixarea chimică

Procesul de fixare asigură stabilizarea structurii biologice cât mai aproape de starea nativă cu ajutorul unor agenţi capabili să formeze legături încrucişate între moleculele materialului prelucrat, realizând un cadru care să nu permită degradarea arhitecturii ultrastructurale.

Tipul de fixator, procedeul folosit la fixare şi durata acţiunii fixatorului depind nu numai de materialul biologic, ci şi de scopul urmărit în cadrul studiului.

Fixatorul se utilizează sub formă de soluţie, într-un mediu tampon (de ex. cacodilat, fosfat), care are rolul de a crea molaritatea necesară mediului de reacţie pentru a acţiona adecvat asupra materialului biologic.

Scanned with OKEN Scanner

Substanţe fixatoare:

a) a căror acţiune se bazează pe reacţii de reducere: aldehide - formaldehida şi glutaraldehida.

Glutaraldehida se prezintă sub formă de soluţie în concentraţie de 25%, cu un anumit grad de puritate; în timp se poate impurifica şi forma un polimer de glutaraldehidă cu proprietăţi fixatoare diminuate; se utilizează ca fixator în soluţie tampon cacodilat în concentraţie de 4 - 6 %.

b) a căror acţiune se bazează pe reacţii de oxidare: oxizi - OsO_4, săruri - $KMnO_4$, $K_2Cr_2O_7$

Tetraoxidul de osmiu (OsO_4) se utilizează sub formă de soluţie în concentraţie de 1 - 2% în tampon cacodilat, la pH = 7,2 - 7,4.

Metode de fixare:

1. fixarea simplă - când se foloseşte o singură soluţie fixatoare
2. fixarea dublă, care este mai larg aplicată, presupune:
   - fixarea cu glutaraldehidă tamponată
   - postfixare cu tetraoxid de osmiu tamponat

Tehnica de lucru

În flacoanele de fixare, numerotate şi prevăzute cu dop (fixatorii sunt toxici), se repartizează soluţia fixatoare la concentraţia adecvată probelor. Fragmentele de ţesut, prelevate şi fasonate, se introduc în flaconul cu glutaraldehidă tamponată, în care vor rămâne câteva ore (în funcţie de tipul materialului) la -4°C în frigider. Înainte de postfixare cu tetraoxid de osmiu se înlătură orice urmă de glutaraldehidă prin trei spălări succesive în aceeaşi soluţie tampon în care a fost preparat fixatorul.

Postfixarea cu tetraoxid de osmiu are, de asemenea, o durată variabilă; urmează înlăturarea acestuia şi spălarea excesului de tetraoxid de osmiu de trei ori în aceeaşi soluţie tampon.

3. Deshidratarea

Ţesuturile se supun deshidratării în vederea includerii în răşini, ai căror precursori nu polimerizează în prezenţa apei.

Scanned with OKEN Scanner

Soluţiile de deshidratare au scopul de a elimina apa legată din ţesuturile fixate fizic sau chimic fără a produce modificări în structura moleculară nativă a celulelor.

Apa este înlăturată treptat prin trecerea probelor prin serii succesive de solvenţi organici, cel mai adesea alcool etilic şi acetonă iar, la etapele finale în oxid de propilen. Alegerea solventului pentru deshidratare este în funcţie de materialul de includere, deoarece, acesta din urmă trebuie să fie miscibil cu agentul de deshidratare.

Probele se trec prin băi succesive de alcool etilic (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%) timp de 15 - 30 min. pentru fiecare baie, apoi acetonă absolută sau oxid de propilen.

4. Includerea

Includerea este etapa în care piesele deshidradate corect se introduc într-un mediu lichid care, prin polimerizare trece în stare solidă. Mediul de includere trebuie să prezinte următoarele calităţi:

* să fie solubil în agenţi de deshidratare;
* să aibă masă moleculară mică şi vâscozitate redusă pentru a pătrunde uşor în ţesuturi;
* să facă masă compactă cu ţesutul în urma polimerizării;
* să polimerizeze uşor fără modificări de volum;
* să permită obţinerea blocurilor de durităţi diferite şi uşor secţionabile;
* să aibă stabilitate mecanică la bombardamentul cu eletroni;
* să nu prezinte toxicitate peste valoarea prag.

Mediile de includere pot fi:

a) hidrofobe: metacrilaţi, răşini poliesterice (de ex. Vestopal) şi răşini epoxidice (de ex. Epon 812, DDSA, MMA)

b) hidrofile: durcupan, glicol-metacrilat, 2-hidroxipropilmetacrilat

Mediile de includere hidrofile prezintă avantajul că evită deshidratarea şi conservă lichidele şi enzimele din celulă, însă răşinile epoxidice reprezintă, în prezent, cele mai bune medii de includere.

Eponul 812 este o răşină epoxi-alifatică cu vâscozitate redusă şi aproape incoloră; pătrunde repede în ţesuturi, formează blocuri a căror duritate poate fi modificată, se secţionează uşor cu ajutorul cuţitului de sticlă, dând secţiuni foarte rezistente la fasciculul de electroni.

Includerea se face în capsule de gelatină care trebuie să fie:

- transparente, pentru a se vedea poziţia piesei în răşină şi pentru a-i da orientarea dorită;

Scanned with OKEN Scanner

- de dimensiuni potrivite, pentru a permite o polimerizare uşoară a monomerilor;
- bine uscate, ceea ce se realizează prin trecerea lor înainte de a fi umplute cu răşină, în termostat la 60° C pentru câteva ore.

Tehnica de lucru

În cazul utilizării răşinilor epoxidice ca mediu de includere se prepară un amestec de răşini, astfel:

Amestecul A = Epon 812 + DDSA

Amestecul B = Epon 812 + MNA

DDSA = anhidridă dodecenil-succinică; MNA = anhidridă metil-nadică

Amestecul final conţine: amestecul A + amestecul B + răşină acceleratoare (DMP-30)

Impregnarea se va realiza în trepte: primele băi vor fi de acetonă-epon în diferite proporţii, apoi se trece la epon pur în flacoane de fixare şi epon pur în capsule de gelatină.

Capsulele de gelatină, numerotate corespunzător, se aşează în poziţie verticală în suporturi de plastic sau de carton; în capsulele pregătite se repartizează, cu ajutorul unei baghete de sticlă, amestecul final de răşini, apoi se plasează câte un cubuleţ de ţesut, în poziţie central axială.

Suportul cu capsule este introdus în termostat la 60° C timp de 48-72 ore, perioadă în care materialul de includere polimerizează. După expirarea acestui timp blocurile scoase din termostat trebuie să fie transparente, suficient de dure şi să conţină în vârful lor piesa de culoare neagră.

Amestecul Epon 812 + DDSA produce blocuri moi, în timp ce amestecul Epon 812 + MNA blocuri foarte dure. Modificând proporţia celor două anhidride se obţine duritatea dorită.

Amestecurile A şi B, ca şi compoziţia finală, trebuie bine omogenizate, iar bulele de aer eliminate.

5. Secţionarea

Probele fixate şi incluse în răşini sunt supuse unor operaţii de secţionare, prin tehnici speciale de ultramicrotomie, pentru a realiza secţiuni ultrafine, a căror grosime nu depăşeste 1000 Å şi care sunt uşor traversate de fasciculul de electroni.

Scanned with OKEN Scanner

Tehnicile de ultramicrotomie se caracterizează printr-o mare finețe, cu ajutorul lor putându-se realiza 20 - 30 de secțiuni (care nu sunt vizibile cu ochiul liber) printr-o celulă cu diametrul de 1 μm, de exemplu o bacterie.

La această mare finețe de secționare s-a ajuns după cercetări îndelungate în domeniul construcției aparatelor de secționat și în direcția stabilirii celor mai bune medii de includere.

Tipuri de ultramicrotoame

În prezent există două tipuri de ultramicrotoame care se deosebesc prin principiul folosit la înaintarea preparatelor către cuțit în timpul procesului de secționare. Astfel, se cunosc: microtoame cu expansiune mecanică și microtoame cu expansiune termică.

Din punct de vedere al construcției, orice microtom este alcătuit dintr-un bloc metalic pe care sunt fixate **tija** de care se fixează preparatul și **mecanismul** de avans al acesteia, **suportul** pentru cuțit, **microscopul stereoscopic** necesar observării proceselor de secționare și reglării aparatului și **sistemul de iluminare;** toate acestea alcătuiesc ultramicrotomul propriu-zis. Separat, se află blocul electronic de control. Ultramicrotomul și blocul electronic sunt fixate pe o masă proprie, prevăzută cu sisteme de presiune și amortizare a vibrațiilor.

a) Ultramicrotoamele cu expansiune mecanică prezintă un mod de operare manual, similar microtoamelor clasice, avansul preparatului către cuțit făcându-se prin intermediul unor roți dințate, în urma acționării cu mâna a unei roți de avans prevăzută cu manivelă.

b) Ultramicrotoamele cu expansiune termică prezintă un mod de operare normal, semiautomat și automat, funcționând pe seama principiului de dilatare termică. Tija metalică (care servește drept suport pentru blocul ce trebuie secționat), fixată cu una din extremități de un cadru, are înfășurată pe ea o bobină; la trecerea unui curent electric de intensitate variabilă, tija metalică se încălzește, se dilată și transmite dilatarea ei numai la extremitatea liberă, determinând înaintarea către cuțit a preparatului. Concomitent cu deplasarea orizontală, tija descrie și o mișcare în plan vertical, de sus în jos (Fig. 11).

Cuțite pentru ultamicrotoame

În perioada de început a ultramicrotomiei, pentru obținerea secțiunilor au fost utilizate cuțite din oțel, foarte adesea fiind adaptate în acest scop lame de ras.

Scanned with OKEN Scanner

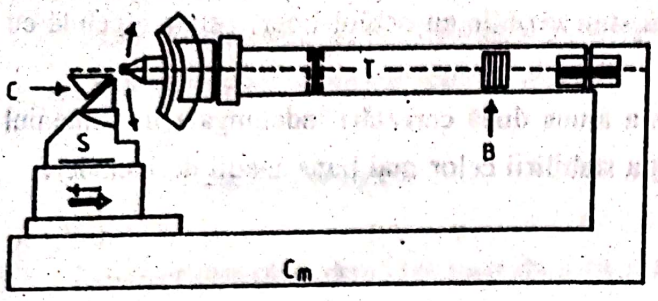


Fig. 11. Principiul constructiv al ultramicrotoamelor cu avans termic; B - bobină pentru încălzirea tijei; C - cuţit; Cm - cadru de metal; T - tijă dilatantă cu preparat; S - suport pentru cuţit (d. Petre şi Ploaie)

Pentru ca acestea să corespundă exigenţelor unui cuţit de ultramicrotom, primele ultramicrotoame erau prevăzute şi cu dispozitive speciale de ascuţire.

a) Cuţitele de sticlă au fost introduse în ultramicrotomie în anul 1950, în urma cercetărilor efectuate de *Latta şi Hatman.*

Pentru obţinerea unor cuţite de calitate se foloseşte sticlă cu grosimea de 5-8 mm (similară celei utilizate la confecţionarea oglinzilor de culoare albă şi nu verzuie), tăiată în benzi şi lipsită de tensiuni interne (Fig. 12 A). Există şi sticlă speţială, trasă în benzi şi livrată odată cu ultramicrotoamele.

Confecţionarea cuţitelor se poate face manual sau cu ajutorul unui aparat special de fracturare, acesta realizând atât operaţia de marcare a limitelor de fracturare, cât şi fracturarea propriu-zisă, prin mărirea presiunii asupra barei de sticlă, fără ca aceasta să fie mişcată din poziţia iniţială.

Cuţitele trebuie selecţionate după calitatea lor, aceasta jucând un rol major în procesul de secţionare. Alegerea se face cu ochiul liber şi la microscopul stereoscopic. Marginea unui cuţit utilizabil la secţionare trebuie să fie subţire şi dreaptă şi să nu prezinte zimţi sau zgârieturi.

Cuţitele se păstrează vertical în stative speciale acoperite sau în plăci Petri pe un pat de plastilină ori vată, în vederea nedeteriorării tăişului şi pentru a fi ferite de praf.

Înainte de folosire, la cuţit se ataşează o mică chiuvetă pentru colectarea secţiunilor pe suprafaţa apei. Aceste chiuvete pot fi metalice sau dintr-un material aderent; în ambele situaţii se izolează cu parafină sau ceară de dinţi supraîncălzită (Fig. 12 B). Operaţiile de montare şi lipire se pot realiza manual sau automat cu un dispozitiv special.

Scanned with OKEN Scanner

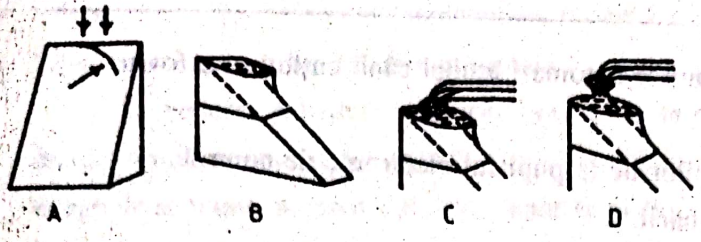


Fig. 12. Aspectul cuţitelor de sticlă: cuţit cu tăişul drept (A), cuţit cu băiţă de metal (B) şi colectarea secţiunilor pe grile (C, D) (d. A - Petre şi Ploaie; B-D - Matienko)

b) Cuţitele de diamant au fost introduse în anul 1953; pot fi utilizate un timp mai îndelungat şi dau posibilitatea secţionării ţesuturilor dure, însă prezintă calitate neuniformă şi preţ de cost ridicat.

Fasonarea şi secţionarea propriu-zisă a blocurilor

Înainte de a fi supuse secţionării, blocurile cu piesele biologice trebuie fasonate, operaţie prin care o anumită porţiune din bloc capătă aspect de piramidă.

Operaţia de fasonare a blocurilor se face manual prin îndepărtarea capsulei de gelatină sub o lupă binocular, cu ajutorul unei lame de ras noi, după fixarea blocului într-un port-bloc. Se confecţionează un trunchi de piramidă, al cărui vârf trunchiat, ce conţine piesa, trebuie să aibă forma unui pătrat, dreptunghi sau trapez.

Fasonarea blocurilor se poate face şi cu ajutorul ultramicrotomului folosindu-se cuţite de sticlă.

Există şi aparate speciale pentru fasonarea blocurilor numite piramidotoame, asemănătoare microtoamelor clasice.

Indiferent de metoda de fasonare, piramida trebuie să fie foarte mică, să aibă laturile netede, deoarece numai din blocurile astfel fasonate se poate obţine o panglică de secţiuni.

Secţionarea propriu-zisă presupune următoarele operaţiuni:

* fixarea blocului cu piramida în port-preparat;
* fixarea port-preparatului în partea terminală a tijei de avans;
* instalarea cuţitului, astfel încât tăişul să fie paralel cu suprafaţa preparatului;
* orientarea cuţitului sub unghi de 6-7^0 în raport cu preparatul;
* introducerea apei în chiuvetă şi stabilirea corectă a gradului său de umplere;
* deplasarea cuţitului spre preparat cu ajutorul vizei macrometrice;

Scanned with OKEN Scanner

* trecerea aparatului pe control automat, atunci când cuţitul este foarte aproape de probă;
* reglarea grosimii secţiunilor de la pupitrul electronic de control;
* urmărirea calităţii secţionării.

Grosimea secţiunilor se poate aprecia prin reflexie în chiuvetă, pe suprafaţa apei; culoarea secţiunilor în lumină reflectată depinde de grosimea acestora.

Pentru cercetările de rutină secţiunile de culoare argintie se consideră convenabile.

Obţinerea unor secţiuni ultrafine de bună calitate depinde de modul în care este fasonat blocul, în special de dimensiunile vârfului şi forma planului de tăiere, de existenţa unui cuţit curat şi de calitate, de nivelul apei la gura cuţitului şi de unghiul de înclinare al cuţitului. Mai trebuie avute în vedere alegerea unei viteze de secţionare mici şi evitarea atingerii preparatului.

Culoarea	Grosimea (Å)
cenuşie	sub 600
argintie	600 - 900
aurie	900 - 1500
purpurie	1500 - 1900
albastră	1900 - 2400
verde	2400 - 2800
galbenă	2800 - 3200

6. Aplicarea secţiunilor pe grile

Dacă secţionarea decurge normal, cu formarea panglicii de secţiuni, acestea urmează să fie depuse pe grile. Pentru aceasta se opreşte aparatul şi panglica se fragmentează cu ajutorul unui fir de păr (de geană) prins cu parafină de un beţişor. Încercarea de a manipula secţiunile cu alte mijloace (de ex. cu un ac) duce la pierderea lor, deoarece acestea se prind foarte uşor de orice material.

Secţiunile se grupează în şiruri paralele, pentru a fi depuse pe grile în număr cât mai mare. Dacă se urmăreşte reconstituirea tridimensională a structurilor cercetate, secţiunile vor fi

Scanned with OKEN Scanner

colectate bucată cu bucată şi numerotate.

În vederea transferării secţiunilor, grila se prinde de o margine cu o pensetă fină şi cu multă atenţie se imprimă acesteia o poziţie orizontală în raport cu penseta, după care grila se atinge de secţiuni; acestea vor adera uşor la grilă; se va avea grijă ca secţiunile să fie depuse pe centrul grilei (Fig. 12 C, D).

Dacă în microscopia fotonică se folosesc ca portobiect lame de sticlă, în microscopia electronică de transmisie portobiectul este o **grilă metalică** şi o **peliculă** de natură organică sau anorganică ce acoperă suprafaţa grilei.

La început s-au folosit ca suport pentru preparat, discuri sau şaibe confecţionate din aliaj de aur sau platină. Ulterior, acestea au fost înlocuite cu grile metalice obţinute prin ştanţare din plase sau reţele de cupru, bronz fosforos sau nichel cu 50-150 ochiuri/cm^2. După anul 1950 s-a trecut la folosirea grilelor produse pe cale electrolitică.

În prezent există o gamă variată de suporturi pentru preparate (grile şi discuri) confecţionate pe cale electrolitică din cupru, nichel, oţel inox, argint, aur, platină, molibden sau tungsten. Grilele electrolitice sunt de mai multe tipuri: a) standard; b) de identificare; c) duble

a) Grilele standard se caracterizează printr-o mare varietate a numărului de ochiuri, unitatea internaţională de identificare fiind mesh-ul, adică numărul de ochiuri pe inch (2,54 cm). Ca suport pentru secţiunile ultrafine, cele mai bune grile sunt cele de 200 mesh acoperite cu peliculă organică sau cele de 300 mesh care pot fi utilizate fără peliculă.

Grilele de 75,100 şi cele de 150 mesh se utilizează mai puţin deoarece au ochiuri foarte mari şi pelicula de colodiu sau de formvar cu care sunt acoperite, dacă nu este întărită cu carbon nu rezistă la bombardamentul cu fasciculul de electroni (Fig. 13 A).

b) Grilele de identificare prezintă specificaţii de referinţă în interiorul ochiurilor, pentru identificarea rapidă a unei zone de interes din preparat (Fig. 13 B_1, B_2).

c) Grilele duble sunt destinate realizării de preparate sub formă de sandwich şi au pe fiecare parte câte un tip de reţea, fiind de fapt două grile suprapuse şi legate între ele (Fig. 13 C).

Pelicule suport

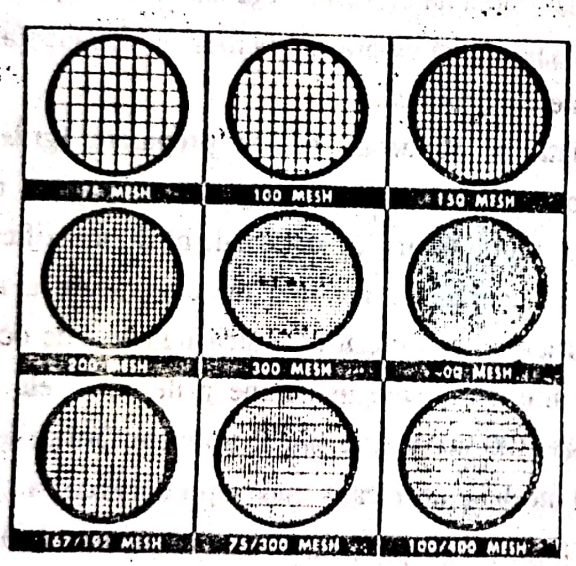
Pentru ca grilele să devină un bun suport pentru preparat, se acoperă cu pelicule organice sau anorganice fine, transparente la fasciculul de electroni, a căror grosime nu trebuie să

Scanned with OKEN Scanner

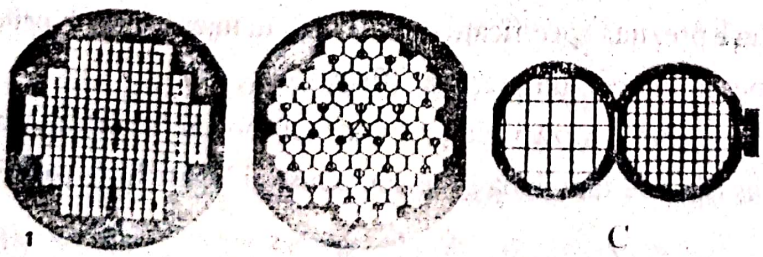
depășească 200 Å.

Peliculele se obțin în laborator și trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

* să nu se deterioreze la depunerea preparatului și în timpul colorării sau spălării;
* să fie lipsite de structură proprie în raport cu rezoluția microscopului;
* să aibă grosime uniformă;
* să prezinte aderența mare, deci să fie hidrofile;
* să nu se încarce electric în timpul iradierii cu electroni;
* să fie complet netede pentru a nu permite interferențe la metalizare;
* să fie stabile la vidul înalt din microscop și la bombardamentul cu electroni



A



1

B

C

a) **Peliculele organice** se obțin prin diferite metode, din materiale dizolvate în solvenți organici. Cele mai utilizate sunt peliculele din nitrat de celuloză în acetat de amil, formvar, polistirol ș.a.

b) **Peliculele anorganice** se folosesc mai ales în cazul cercetărilor care necesită o înaltă rezoluție. Pentru aceasta se folosesc pelicule din: aluminiu, beriliu, monoxid de siliciu sau cuarț, ce se obțin prin evaporarea în vid a acestor metale. În vederea măririi rezistenței la fluxul de electroni pe suprafața peliculei se depune un strat subțire și uniform de carbon

Fig. 13. Seria de grile standard, de la 75 la 400 mesh (A), grile de identificare (B: 1 - H, London, 2 - H, London fagure), grilă dublă, desfăcută (C) (d. Petre și Ploaie)

Scanned with OKEN Scanner

cu ajutorul unui aparat de carbonare sub vid înalt (10^{-5} - 10^{-6} Torr).

7. Contrastarea

Probele secţionate, datorită fineţii lor şi a compoziţiei chimice (conţinând atomi cu numărul Z mic), au putere mică de împrăştiere a electronilor şi, ca urmare, contrastul acestora la microscop este foarte redus. De aceea, pentru evidenţierea structurilor biologice pe secţiuni ultrafine este necesară contrastarea preparatelor. Dacă în microscopia fotonică diferenţierea componenţilor ţesutului se realizează cu ajutorul colorării, în microscopia electronică, "coloranţii" sunt substanţe care conţin elemente cu masă atomică mare capabile să disperseze intens electronii.

Contrastarea pozitivă se bazează pe interacţiunea chimică dintre structurile biologice şi un contrastant format din săruri ale unor metale grele. În acest caz mediul de includere nu se colorează, ci apar contrastate numai suprafeţele tăiate ale ţesuturilor, dacă grupele lor de reacţie nu au fost blocate în timpul prelucrării anterioare. Contrastul trebuie să apară ca urmare a împrăştierii electronilor datorită cantităţii de "colorant" pătrunsă în structurile biologice.

Una din cele mai frecvent utilizate metode (metoda Reynolds) presupune aplicarea consecutivă a uranil acetatului şi citratului de plumb. Prin utilizarea în comun a celor doi "coloranţi" contrastul preparatului este mult mai mare decât în cazul utilizării lor separate.

Pe o placă de parafină curată se pune un număr de picături de uranil acetat, corespunzător numărului de probe de "colorat". Peste fiecare picătură se aşează grila cu secţiuni spre soluţie în care se ţine 10 minute, după care se spală cu apă bidistilată. În mod similar se trec grilele cu secţiuni şi prin soluţia de citrat de plumb, după care se spală din nou cu apă bidistilată, iar excesul de apă se elimină cu o hârtie de filtru, după care secţiunile pot fi examinate la microscopul electronic.

Contrastarea negativă este metoda care se utilizează larg pentru studiul virusurilor, bacteriilor şi a fracţiunilor celulare, însă nu şi pentru secţiunile ultrafine. Dacă proba este cufundată într-o substanţă electronodensă care nu colorează obiectul, dar formează în jurul său un fond întunecat, atunci contrastarea este negativă.

Contrastul poate să pătrundă şi în spaţiile dintre componenţii structurali de la suprafaţa lor externă contribuind la generarea de contrast între detaliile de structură.

Substanţele care pot fi utilizate în acest caz sunt acidul fosfotungstic, tungstat de sodiu,

Scanned with OKEN Scanner

de litiu, molibdat de amoniu, silicat de sodiu, nitrat de uranil, acetat de uranil.

"Colorarea" se poate realiza: direct, pe grilă, prin imersiune, prin flotare şi prin pulverizare.

Secţiunile semifine se obţin cu ajutorul ultramicrotomului, prin folosirea avansului manual, cu scopul de a verifica dacă blocul respectiv conţine elementele pe care ni le-am propus spre examinare sau în alte tipuri de cercetări curente. Secţiunile semifine se culeg din chiuveta cuţitului cu o ansă de sârmă subţire şi se aşează pe o lamă port-obiect degresată, iar apa este înlăturată prin încălzirea lamei la flacără, ceea ce realizează şi aderenţa secţiunilor pe lamă.

Pentru colorare se prepară o soluţie de 0,05% albastru de toluidină în apă distilată.

Tehnica de lucru

- pe lama cu secţiuni se aplică 2-3 picături din soluţia de albastru de toluidină;
- lamele se introduc în termostat la 60°C timp de 10-20 min;
- se spală cu apă distilată;
- se spală cu acetonă 100%;
- se trec prin xilol;
- se montează în balsam de Canada şi se examinează la microscopul electronic.

Tehnici de lucru în microscopia electronică cu baleiaj

Microscopul electronic cu baleiaj permite cercetarea configuraţiei de suprafaţă a oricărei structuri biologice, după ce în prealabil a fost pregătită pentru examinare.

Preparatele biologice care pot fi examinate în microscopia eletronică cu baleiaj au dimensiuni foarte variate, de la câţiva μm la câţiva cm, iar suportul pentru preparat diferă de grilele folosite în microscopia electronică cu transmisie, fiind mici cilindri sau discuri de aluminiu cu diametrul de câţiva cm. În general probele special pregătite sunt dispuse pe suprafaţa acestor suporturi şi lipite cu o substanţă având conductibilitate electrică mare.

Pentru a păstra nealterată structura diferitelor preparate ce urmează a fi examinate în microscopia electronică cu baleiaj se folosesc în principiu aceleaşi metode ca şi în microscopia electronică prin transmisie, şi anume, fixarea pe cale chimică sau fizică, mai ales pentru

Scanned with OKEN Scanner

țesuturile moi.

Unele preparate dure cum sunt lemnul, osul, insectele chitinoase, unele frunze nu necesită tratamente speciale de fixare. Astfel, căile de examinare a preparatelor în microscopia electronică cu baleiaj ar fi: a) examinarea fără nici un tratament prealabil; b) examinarea după o tratare specială prin fixare și deshidratare;

În ambele situații însă, înainte de examinare este necesară operația de metalizare.

Fixarea se poate realiza prin metode fizice (congelare și uscare în vid sau uscare la punctul critic al CO_2) sau chimice (similare celor folosite în microscopia electronică cu transmisie).

Metoda de fixare prin congelare și uscare în vid prezervă cel mai bine structura tridimensională a probelor biologice; formarea cristalelor de gheață în celule poate fi prevenită prin imersiunea țesuturilor în etanol. Folosirea unor gaze miscibile cu apa, al căror punct critic este sub 160°C, cum sunt CO_2, SO_2, hexafluoracetona, amoniacul și freonul, fac ca la deshidratare să nu apară modificări în țesuturi.

În cazul fixării chimice pot fi folosite oricare din soluțiile fixatoare utilizate în microscopia electronică cu transmisie. Fixarea în glutaraldehidă, urmată de postfixarea în tetraoxid de osmiu s-a dovedit convenabilă; după spălare și deshidratare în serii succesive de acetonă, preparatul scos din acetonă 100 % sau acetonitril se usucă la aer pe hârtie de filtru.

Pentru a crește conductibilitatea electrică și termică a preparatului și pentru a preveni fenomenele de încărcare electrostatică și denaturările prin căldură este nevoie ca preparatele să fie metalizate. Practica arată că cele mai bune materiale pentru metalizare sunt cele cu densitate mare și care se depun în cantitate mică, asigurând un contrast bun preparatelor biologice. Se includ aici: argintul, aurul, aliajul aur - paladiu, uraniul, tungstenul, platina etc., care sunt active în generarea de electroni secundari.

Numeroase firme produc diferite tipuri de aparate folosite pentru metalizare, din ce în ce mai perfecționate, ce realizează un vid înaintat, necesar unei evaporări de mare finețe; acestea au surse multiple de evaporare, oferind posibilitatea evaporării simultane din mai multe surse și a aprecierii grosimii stratului de metal chiar în timpul depunerii.

Informațiile furnizate de microscoapele electronice cu transmisie și cu baleiaj mult superioare altor metode, oferă largi posibilități de investigație în cunoașterea particularităților structurale și ultrastructurale ale lumii vii.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL II

ORGANIZAREA GENERALĂ A CELULEI VEGETALE

Plantele (ca şi animalele) sunt alcătuite din unităţi elementare fundamentale numite **celule.** Celula este o unitate de compoziţie chimică şi structurală.

Există plante unicelulare şi plante pluricelulare. În al doilea caz celulele pot fi grupate în ţesuturi specializate pentru îndeplinirea unei funcţii bine determinate. Ţesuturile sunt fie omogene, fie heterogene.

Noi vom utiliza adesea un ţesut omogen (de ex. epiderma unei tunici de ceapă). Vom observa şi un ţesut heterogen (de ex. ţesutul conducător al sevei în plantă).

În toate cazurile, celula, ale cărei forme şi conţinut pot fi foarte variabile, rămâne unitatea anatomică şi fiziologică comună întregii plante.

Observarea formei şi dimensiunilor celulelor vegetale

Celulele vegetale, din punct de vedere al formei, mărimii şi structurii sunt foarte variate.

1° Forma

A. Material:

Pentru ilustrarea diversităţii de formă a celulei vegetale se utilizează ca material:

- **viu** - frunze de la planta numită telegraf (***Zebrina pendula***, fam. *Commelinaceae*)
- **fixat** -

- suberul tulpinii de soc (***Sambucus nigra***, fam. *Caprifoliaceae*)
- tulpină de rugină (***Juncus sp.***, fam. *Juncaceae*)
- frunze de: micsandre (***Matthiola incana***, fam. *Brassicaceae*), stânjenel (***Iris germanica***, fam. *Iridaceae*), grâu (***Triticum aestivum***, fam. *Poaceae*) şi pin (***Pinus sp.***, fam. *Pinaceae*)

Scanned with OKEN Scanner

B. Protocol experimental:

● Se desprinde un fragment din epiderma inferioară a frunzei de telegraf (secţiune superficială) şi se montează într-o picătură de apă între lamă şi lamelă, obţinându-se un preparat temporar.

●● Se utilizează preparate permanente (durabile) cu secţiuni transversale (prin suberul tulpinii de soc, tulpina de rugină şi frunza de pin) şi superficiale (epiderma frunzelor de micsandre, stânjenel şi grâu), colorate cu verde-iod şi carmin alaunat şi montate în glicero-gelatină conform tehnicilor de lucru descrise în capitolul introductiv.

C. Observaţii:

Din categoria celulelor parenchimatice (izodiametrice) se observă următoarele forme de celule:

- poliedrice, în epiderma frunzei de telegraf (Fig. 14);
- tabulare (tabelare, dreptunghiulare), cu dispoziţie radiară, în suberul tulpinii de soc (Fig. 15);
- stelate, în parenchimul medular din tulpina de rugină (Fig. 16);
- neregulat - ramificate, în cazul perilor tectori unicelulari ramificaţi, la micsandre (Fig. 17);
- reniforme, cum sunt celulele stomatice din epiderma frunzei de stânjenel (Fig. 18);
- halteriforme, caracteristice celulelor stomatice din epiderma frunzei de porumb (Fig. 19);
- septate, în parenchimul asimilator al frunzei de pin (Fig. 20).

D. Interpretare:

Toate celulele analizate în exemplele date au formă stabilă, datorită prezenţei peretelui celular celulozo-pectic rigid; astfel de celule se numesc **dermatoplaste**; dimpotrivă, celulele lipsite de perete, au formă variabilă, modificabilă de la un moment la altul şi se numesc **gimnoplaste.** Aspectul variat al celulelor dermatoplaste depinde de poziţia lor în alcătuirea unui ţesut, de nivelul diferenţierii şi specializării la care acestea au ajuns şi de funcţia pe care ele o îndeplinesc. Diferitele forme de celule întâlnite în ţesuturile vegetale se pot clasifica după valoarea raportului lungime/lăţime în: **parenchimatice** (izodiametrice) şi **prozenchimatice** (anizodiametrice sau heterodiametrice).

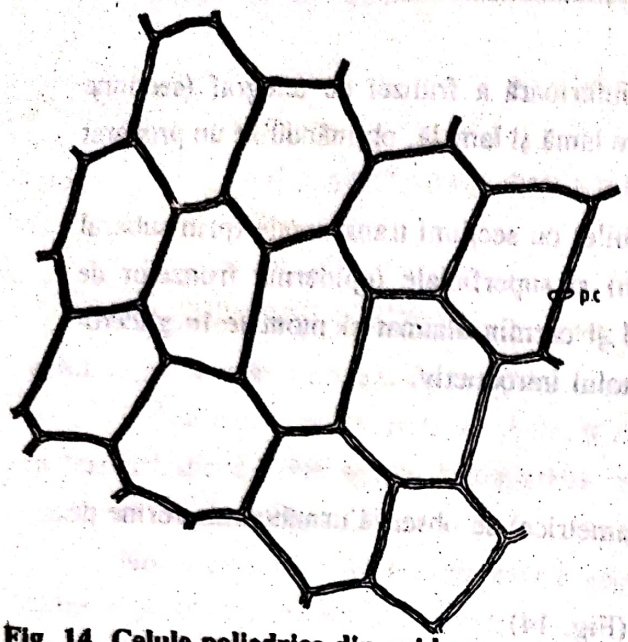


Fig. 14. Celule poliedrice din epiderma superioară a frunzei de telegraf (*Zebrina pendula*), secțiune superficială; **p.c.** - perete celular (orig.)

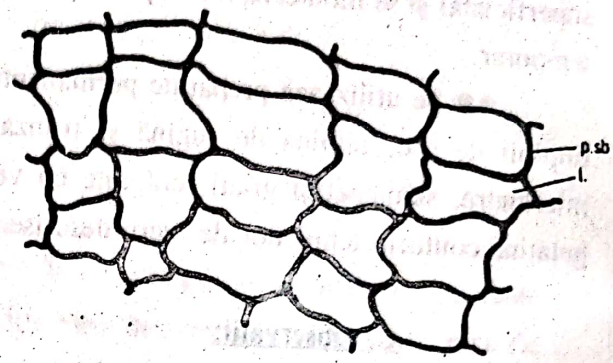


Fig. 15. Celule tabulare din suberul tulpinii de soc (*Sambucus nigra*), secțiune transversală; **l.** - lumen; **p.sb.** - perete suberificat (orig.)

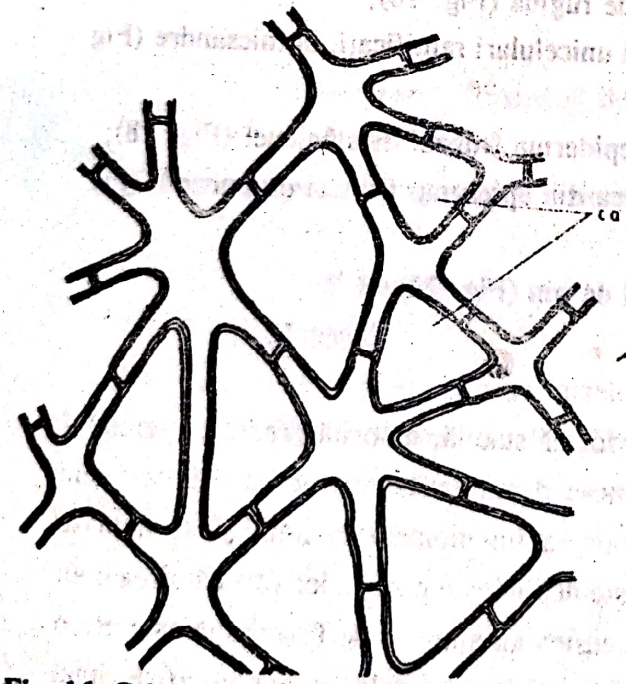


Fig. 16. Celule stelate din parenchimul medular al tulpinii de rugină (*Juncus* sp.), secțiune transversală; **c.a.** - canale aerifere (orig.)

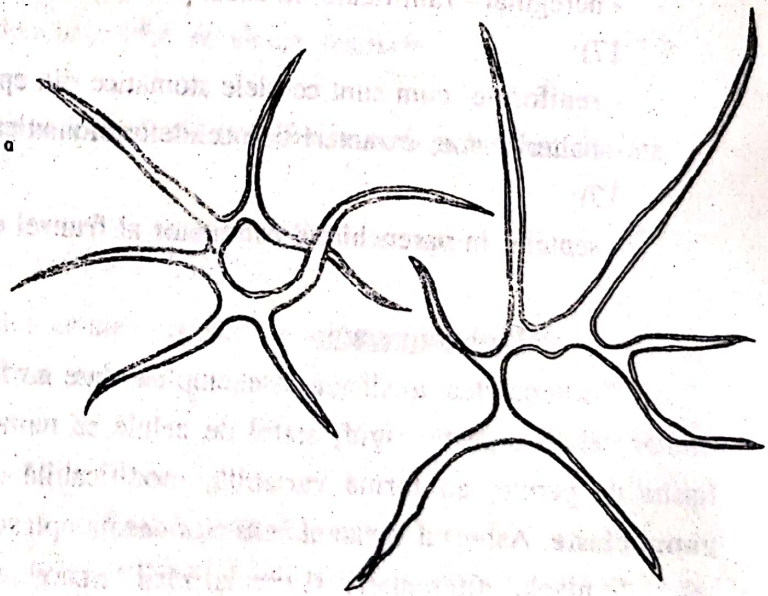


Fig. 17. Celule neregulat ramificate (peri protectori) de la frunza de micsandră (*Mathiola incana*), observate de față (orig.)

Scanned with OKEN Scanner

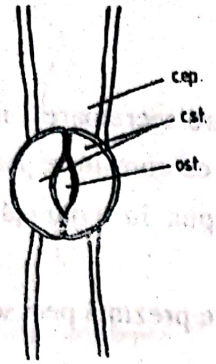


Fig. 18. Celule stomatice reniforme din epiderma frunzei de stânjenel (*Iris germanica*), secțiune superficială; **c.ep.** - celulă epidermică; **c.st.** - celule stomatice; **ost.** - ostiolă (orig.)

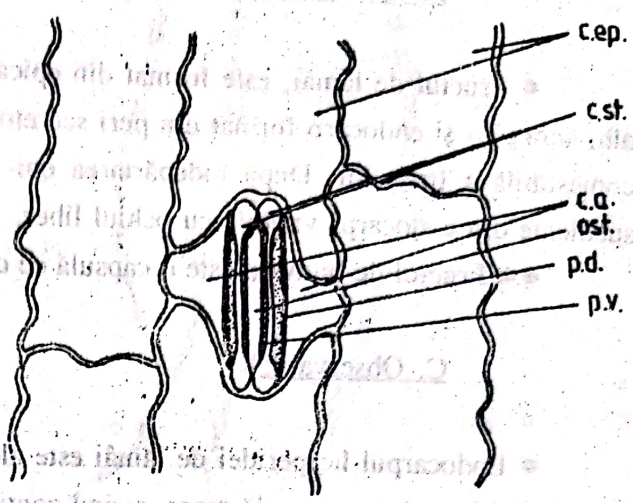


Fig. 19. Celule stomatice halteriforme din epiderma frunzei de porumb (*Zea mays*), secțiune superficială; c.a. - celule anexe; c.ep - celule epidermice; c.st - celule stomatice; ost. - ostiolă; p.d. - perete dorsal; p.v. - perete ventral (orig.)

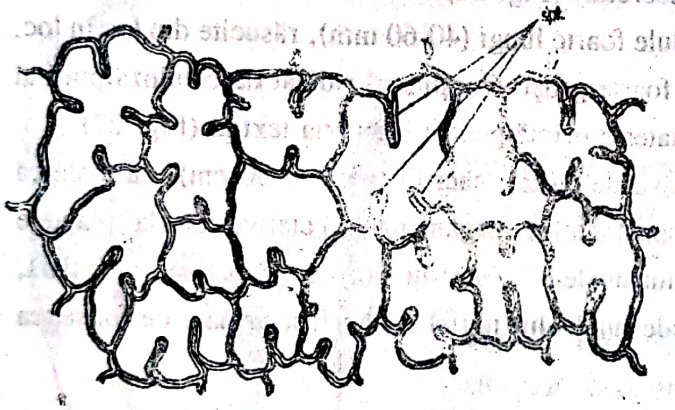


Fig. 20. Celule septate din mezofilul frunzei de pin (*Pinus sylvestris*), secțiune transversală; spt. - septumuri (orig.)

2° Dimensiunile

A. Material:

- Fruct (hesperidă) de lămâi (*Citrus limon*, fam. *Rutaceae*)
- Semințe de bumbac (*Gossypium hirsutum*, fam. *Malvaceae*)
- Talul algei *Caulerpa prolifera*, fam. *Caulerpaceae*

Scanned with OKEN Scanner

B. Protocol experimental:

• Fructul de lămâi, este format din epicarp pielos (cu buzunare secretoare), mezocarp alb, spongios şi endocarp format din peri secretori unicelulari, lungi, ce constituie partea comestibilă a fructului. După îndepărtarea epi- şi mezocarpului se pun în evidenţă celulele suculente din endocarp, vizibile cu ochiul liber.

•• Fructul de bumbac este o capsulă ce conţine seminţele, care prezintă peri seminali.

C. Observaţii:

• Endocarpul hesperidei de lămâi este alcătuit din celule macroscopice, de dimensiuni medii (10-20 mm), cu vacuolă mare, având conţinut ridicat în acid citric. Unii autori consideră aceste celule suculente drept veritabili peri secretori (Fig. 21).

•• Perii seminali de bumbac sunt celule foarte lungi (40-60 mm), răsucite din loc în loc, cu lumenul filiform şi cu pereţii celulozici, foarte groşi. Conţinutul ridicat de celuloză pură al pereţilor fac din aceste celule o valoroasă materie primă pentru industria textilă (Fig. 22).

••• ***Caulerpa prolifera*** este o algă verde cu tal macroscopic (15-50 cm); cu toate că prezintă false diferenţieri morfologice, asemănătoare organelor vegetative de la plantele superioare, el reprezintă o singură celulă plurinucleată, cu structură cenocitică sau sinciţială, aceasta însemnând că diviziunile succesive ale nucleului iniţial nu au fost urmate de formarea unor pereţi despărţitori (Fig. 23).

D. Interpretare:

Marea majoritate a celulelor vegetale au dimensiuni micrometrice, aflându-se în general, sub limita capacităţii de decelare a vederii libere.

Celulele parenchimatice şi prozenchimatice se situează în limita dimensiunilor medii de 10-100 μm, fiind vizibile la microscopul obişnuit. Există însă şi celule mari sau foarte mari, care se află deasupra limitei superioare a dimensiunilor medii sau sub limita inferioară a acestora, ca în cazul celulelor bacteriene.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 21. Celule suculente din endocarpul fructului de lămâi (*Citrus limon*), observate macroscopic (orig.)

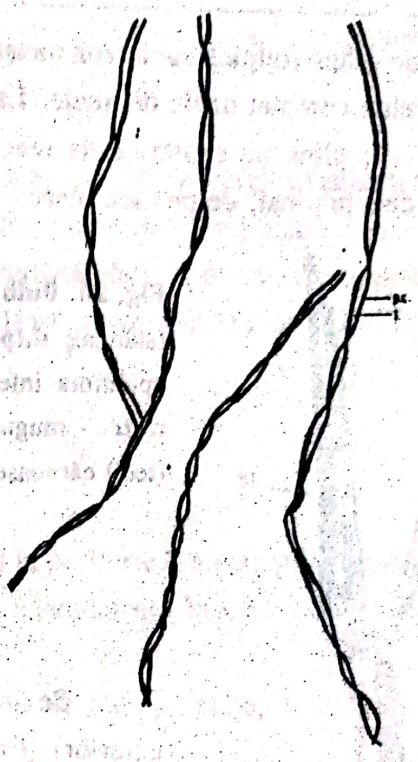


Fig. 22. Peri de pe sămânţa de bumbac (*Gossypium hirsutum*), observaţi de faţă; l. - lumen; p.c. - perete celular (orig.)

Fig. 23. Talul algei *Caulerpa prolifera*, observat macroscopic (orig.)

Principalii constituenţi celulari

Scopul nostru este de a studia organizarea generală a celulei vegetale: fără cloroplaste (neclorofiliană) şi cu cloroplaste (clorofiliană) şi de a-i descoperi structurile esenţiale.

1. Observarea celulelor neclorofiliene

1⁰ Celula vie

A. Material:

- Epiderma superioară (internă) a unei tunici mijlocii din bulbul de ceapă (***Allium cepa***, fam. *Liliaceae*) (Fig. 24)

Bulbul de ceapă (tulpină subterană metamorfozată) este tunicat. Tunicile, baze de frunze (teci), sunt învelite complet unele de altele. La exterior ele sunt uscate, moarte; spre interior sunt cărnoase, vii, pline cu substanţe de rezervă. Ele înconjoară un mugur terminal şi sunt inserate pe un disc tulpinal, de pe care pleacă rădăcini adventive, adesea deshidratate.

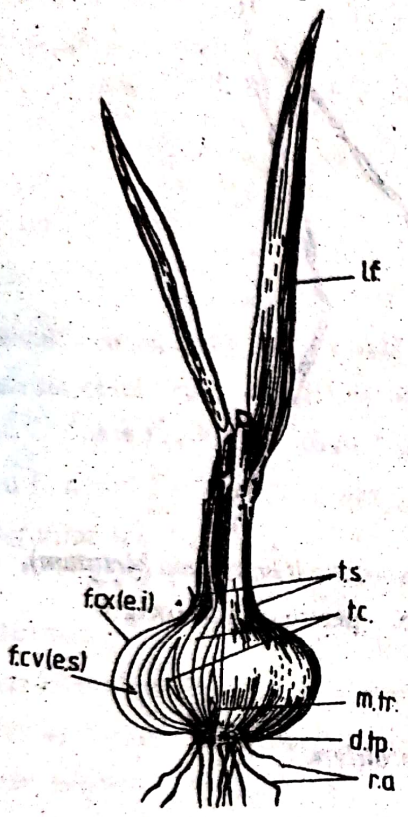


Fig. 24. Bulb de ceapă (*Allium cepa*): **întreg** (dreapta), **secţionat** (stânga); **d.tp.** - disc tulpinal; **e.s.** -epiderma superioară; **e.i.** - epiderma inferioară; **f.cv.** - faţă concavă; **f.cx.** - faţă convexă; **m.tr.** - mugur terminal; **r.a.** - rădăcini adventive; **t.c.** - tunici (teci) cărnoase; **t.s.** - tunici (teci) solzoase (d. Nultsch)

B. Protocol experimental:

Se izolează o tunică mijlocie (a 3-a sau a 4-a de la exterior) (Fig. 25 A). Se detaşează, cu acul spatulat sau cu penseta, un fragment din epiderma superioară, situată pe partea concavă a tunicii; fragmentul de epidermă, de cel puţin 4 mm², este montat într-o picătură de apă, pe o lamă de sticlă, peste care se aşează o lamelă (este de dorit ca faţa externă a fragmentului să se afle lângă lamelă).

C. Observaţii:

a) **La obiectivul mic** (Fig. 25 B)

Se observă celule alungite care formează un ţesut epidermic. Ele sunt delimitate de un perete scheletic. În interior se vede bine nucleul, sub două aspecte: lenticular, văzut din profil, situat lângă un perete vertical al celulei; rotunjit, văzut din faţă, situat în citoplasma de lângă un perete orizontal al celulei.

b) **La un obiectiv mult mai puternic** (Fig. 25 C)

- Peretele scheletic:

Prin mişcarea şurubului micrometric (viza micrometrică), la mijlocul grosimii sale, apare vizibilă o linie fină, numită lamelă mediană, de natură pectică, ce separă două celule vecine; de o parte şi de alta se observă câte o zonă albă, aparţinând fiecăreia din celulele vecine: acestea

Scanned with OKEN Scanner

sunt îngroşările celulozice. Peretele scheletic este deci pecto-celulozic. În grosimea sa există gâtuituri (ştrangulări): acestea sunt punctuaţiile.

- Citoplasma:

Citoplasma se prezintă ca o masă granulară, hialină, a cărei substanţă fundamentală numită hialoplasmă, se deplasează fără încetare datorită curenţilor (mişcărilor) citoplasmatici, ceea ce constituie cicloza (dineza). Ea tapisează pereţii celulari, numindu-se citoplasmă parietală, înconjoară nucleul, numindu-se citoplasmă perinucleară, traversează volumul vacuolei, numindu-se citoplasmă trabeculară.

- Nucleul şi alte organite:

Este organitul cel mai important. Prezintă la periferie o anvelopă (membrană dublă) iar masa sa fundamentală, fin granulară constituie nucleoplasma, în care sunt vizibili adesea doi nucleoli.

În plus, în citoplasmă se mai pot observa şi alte organite, mult mai mici, numite mitocondrii.

- Limitele citoplasmei:

Sunt constituite din două membrane biologice vii, simple: cea externă, alipită de peretele scheletic, este *plasmalema*, iar cea internă, la periferia vacuolei, este *tonoplastul*.

- Vacuola:

Ocupă o poziţie centrală şi reprezintă partea optic vidă a celulei, cea mai vastă.

D. Interpretare:

Celula observată este o celulă adultă, căci ea are o singură vacuolă mare,centrală; este vie datorită prezenţei mişcărilor citoplasmei. Hialoplasma este în stare coloidală, fiind formată din macromolecule sau din micele, aflate în faza de dispersie. După cantităţile lor relative, hialoplasma este fie un plasmosol, fie un plasmogel. Între ele se stabilesc forţe de coeziune, ce se exercită mai ales la interfaţa plasmosol-plasmogel. Astfel se creează mişcări direcţionate ale hialoplasmei.

Scanned with OKEN Scanner

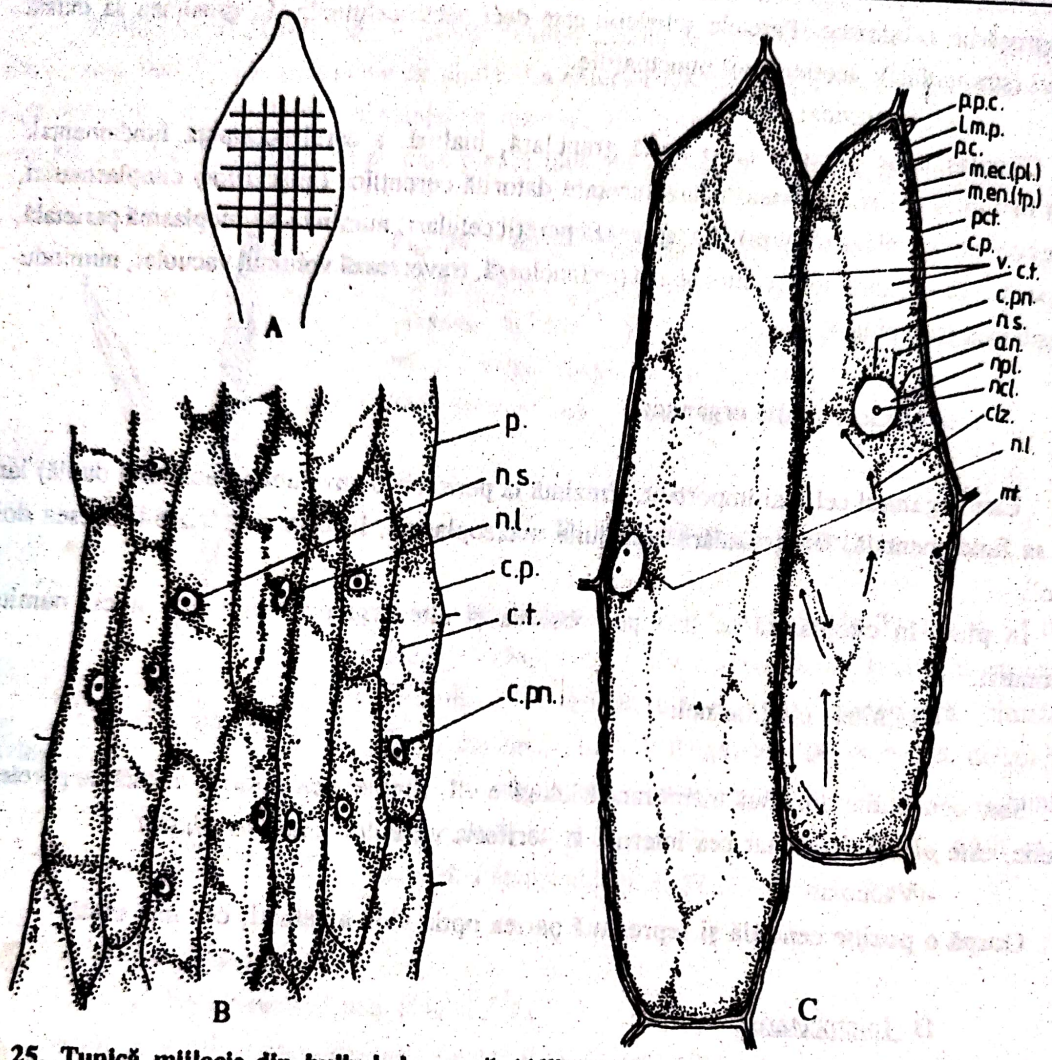


Fig. 25. Tunică mijlocie din bulbul de ceapă (*Allium cepa*): observată de față (A); fragment din epiderma superioară a tunicii, secțiune superficială (B); alcătuirea generală a celulei neclorofiliene din epiderma superioară a tunicii (C): **a.n.** - anvelopă nucleară; **clz.** - curenți de cicloză; **c.p.**- citoplasmă parietală; **c.pn.** - citoplasmă perinucleară; **c.t.** - citoplasmă trabeculară; **l.m.p.** - lamelă mediană pectică; **mt.** - mitocondrii; **m.ec. (pl.)** - membrană ectoplasmică (plasmalemă); **m.en. (tp.)** - membrană endoplasmică (tonoplast); **ncl.** - nucleol; **npl.** - nucleoplasmă; **n.l.** - nucleu lenticular (văzut din profil); **n.s.** - nucleu sferic (văzut de față) ; **p.** - perete celular; **pct.** - punctuații; **p.c.** - pereți celulozici; **p.p.c.** - perete pecto-celulozic; **v.** - vacuole (d. **A** - Savouré și Verger-Lagadec; **B, C** - orig.)

Scanned with OKEN Scanner

2° Celula moartă

A. Material:

● Epiderma superioară (internă) a unei tunici mijlocii din bulbul de ceapă (*Allium cepa*, fam. *Liliaceae*).

B. Reactiv:

Lugol sau reactiv iodo-iodurat.

C. Protocol experimental:

Se imersează fragmente proaspete în reactivul conţinut într-o sticlă de ceas, timp de 15 minute. Apoi sunt spălate în apă şi montate într-o picătură de apă, între lamă şi lamelă.

D. Observaţii:

Mişcările citoplasmei nu mai sunt vizibile. Hialoplasma şi nucleul s-au coagulat şi colorat în galben, iar incluziunile hialoplasmei şi nucleolii nucleului în brun. Amplasarea vacuolei corespunde zonelor necolorate şi necoagulate ale celulei.

E. Interpretare:

Absenţa ciclozei indică faptul că celula este moartă. Membranele biologice sunt distruse: limitele citoplasmei şi vacuolei nu mai sunt vizibile. Totuşi, se pot recunoaşte diferitele poziţii ale citoplasmei. Lugolul creează adesea artefacte: citǎm, în special, posibilitatea de a observa o aoreolă negranulară în jurul nucleului. Acest reactiv este, din acest punct de vedere, un fixator celular mediocru.

Se pot deosebi celule moarte şi atunci când montăm fragmentul de epidermă în apă. Celulele lezate mecanic sunt situate pe marginile fragmentului proaspăt; ele au acelaşi aspect ca şi precedentul, dar nu sunt colorate.

3° Celula fixată şi colorată

A. Material:

● Epiderma superioară (internă) a unei tunici mijlocii din bulbul de ceapă (*Allium cepa*, fam. *Liliaceae*).

Scanned with OKEN Scanner

B. Reactivi:

Alcool de 95°.

Thionină fenică.

C. Protocol experimental:

Se imersează fragmente de epidermă într-o sticlă de ceas conţinând alcool, timp de aproximativ 2 minute. Se spală cu apă şi se pun într-o sticlă de ceas cu thionină fenică, timp de 5 minute. Se spală din nou şi se montează în apă.

D. Observaţii:

În celulele în care nu se decelează vreo mişcare a citoplasmei, se observă două tipuri de colorație: o colorație albastră a nucleului (nucleoplasma); o colorație roză a peretelui, a nucleolilor şi a citoplasmei.

E. Interpretare:

Celula fixată cu alcool este o celulă moartă. Thionina fenică, de culoare albastră, colorează structurile celulare într-o culoare diferită de a sa: acesta este un colorant metacromatic.

2. Observarea celulelor clorofiliene

A. Material:

- Tulpină foliată de ciuma apelor (***Elodea canadensis***, fam. *Hydrocharitaceae*) (Fig. 26 A)

B. Protocol experimental:

Se ia o frunză tânără, situată la nivelul mugurului terminal. Se pune în apă, între lamă şi lamelă (Fig. 26 B).

C. Observaţii:

Celulele au aceeaşi structură ca şi cele ale epidermei superioare de la o tunică a bulbului de ceapă. În plus, hialoplasma conţine organite verzi numite cloroplaste. Ele se deplasează fiind antrenate de mişcările hialoplasmei. Acestea din urmă sunt foarte nete, mai ales în celulele alungite ale zonei mediane a frunzei (Fig. 26 C).

D. Interpretare:

Celula observată, conţine cloroplaste. Deplasarea lor materializează, în mod spectacular, mişcările masei fundamentale a celulei.

Celula vegetală prezintă constituenţi comuni cu cei ai celulei animale (citoplasmă, nucleu,

mitocondrii), dar şi constituenţi proprii care permit a nu le confunda (perete, vacuolă, plastide). Aceştia din urmă fac obiectul studiilor detaliate din capitolele următoare.

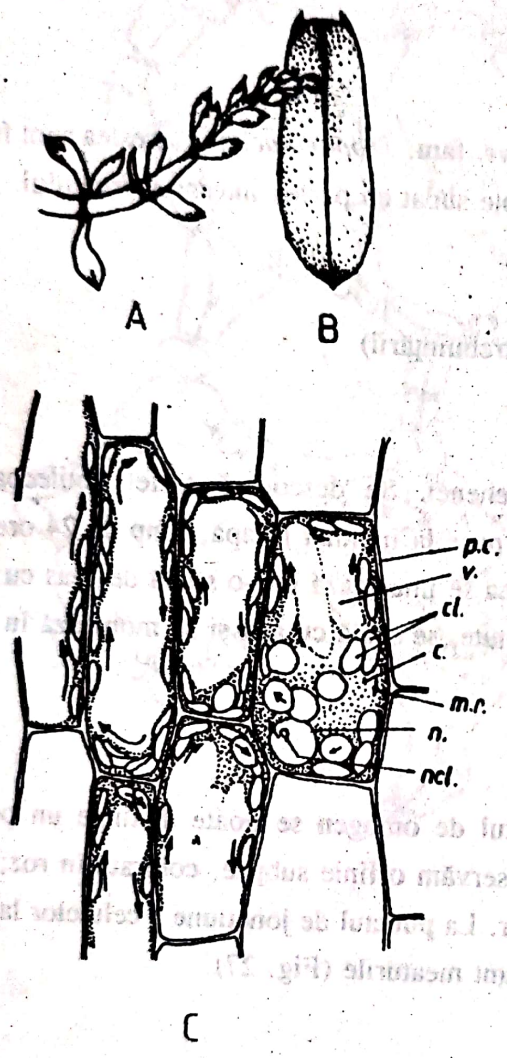


Fig. 26. Celulele clorofiliene din frunza de cluma apelor (*Elodea canadensis*): fragment de tulpină foliată (A); frunză întreagă (B); celule foliare, observate de faţă (C); **c.** - citoplasmă; **cl.** - cloroplaste; **n.** - nucleu; **ncl.** - nucleol; **m.r.** - mişcare de rotaţie; **p.c.** - perete celular; **v.** - vacuolă (d. Braune şi colab.)

PERETELE CELULAR

Este un constituent specific tuturor celulelor plantelor superioare şi a majorităţii celor inferioare. El reprezintă un înveliş scheletic, discontinuu, elaborat de citoplasmă, ce imprimă celulelor o anumită formă, separându-le unele de altele.

Este format în principal din celuloză, hemiceluloze şi compuşi pectici. În anumite cazuri el se poate impregna cu alte substanţe, cum ar fi lignina. Apare în urma diviziunii celulelor meristematice (primare şi secundare), în telofază, plecând de la produşi metabolizaţi în celulă. Se formează mai întâi lamela mediană; apoi, de o parte şi de alta a ei au loc depuneri succesive de celuloză. Discontinuitatea peretelui se datoreşte existenţei punctuaţiilor străbătute de plasmodesme; acestea permit comunicaţiile la nivelul conţinuturilor celulare, ca şi schimburile de apă, şi de substanţe dizolvate între celule şi cu mediul exterior.

Scanned with OKEN Scanner

1. Evidenţierea lamelei mediane (mijlocii)

A. Material:

- "Seminţe" de conduraşi (*Tropaeolum majus*, fam. *Tropaeolaceae*); acestea sunt fructe uscate indehiscente (achene); tegumentul seminal este sudat cu partea internă a fructului.

B. Reactiv:

Roşu de Rutheniu (preparat în momentul întrebuinţării)

C. Protocol experimental:

Se îndepărtează partea spongioasă a achenei. Se descoperă astfel cotiledoanele înconjurate de un tegument subţire, brun; ele sunt puse la înmuiat în apă, timp de 24 ore. Se execută secţiuni subţiri cu ajutorul briciului. Acestea se imersează într-o sticlă de ceas cu apă, apoi se pun în reactiv, în care se ţin timp de 3 minute, se spală cu apă şi se montează în apă, între lamă şi lamelă.

D. Observaţii:

Între celulele care constituie un ţesut destul de omogen se poate distinge un perete scheletic foarte gros. La mijlocul grosimii sale observăm o linie subţire, colorată în roz; este lamela mediană sau "cimentul mijlociu" al celulelor. La punctul de joncţiune a celulelor lamela mediană delimitează spaţii triunghiulare: acestea sunt meaturile (Fig. 27).

E. Interpretare:

Roşu de Rutheniu colorează selectiv compuşii pectici în roz. Deci, lamela mediană este de natură pectică. La nivelul meaturilor ea suferă un clivaj şi este mai subţire decât în alte locuri.

Compuşii pectici, constituenţi esenţiali ai lamelei mediane, sunt formaţi din pectină, pectoze şi acizi pectici; aceştia sunt derivaţi ai acizilor uronici dispuşi în lanţuri lineare, în care se integrează glucide de tipul arabinozei, galactozei ş.a.

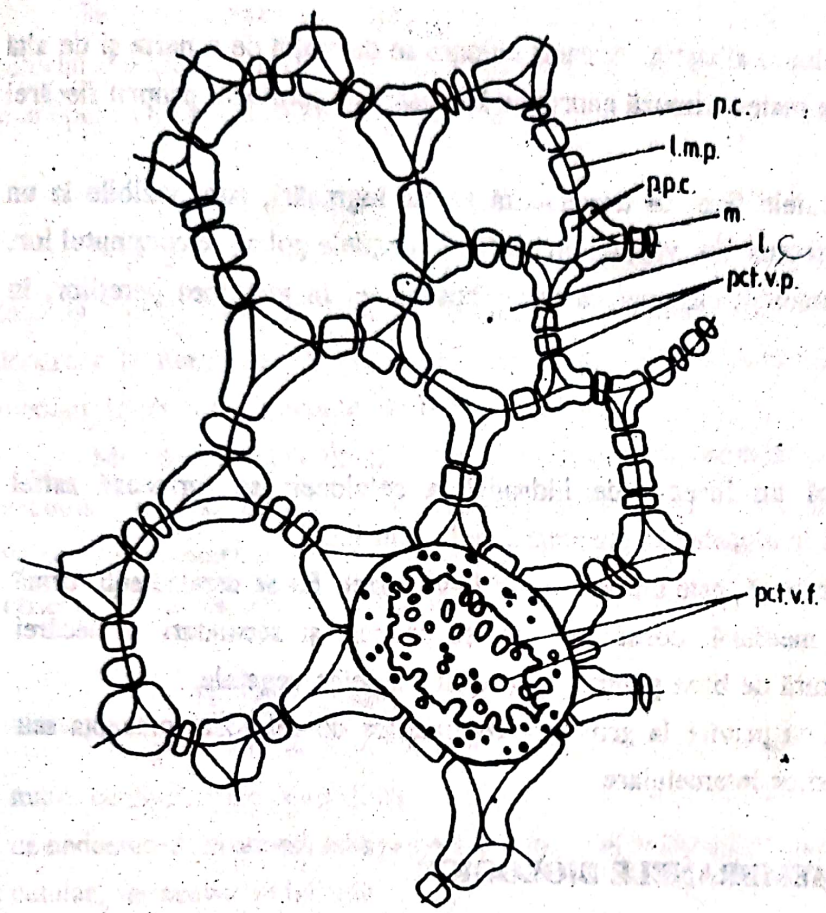


Fig. 27. Celule din cotiledonul embrionului seminţei de conduraşi (*Tropaeolum majus*), secţiune transversală; **l.c.** - lumen celular; **l.m.p.** - lamelă mediană pectică; **m.** - meat; **p.c.** - perete celular; **p.p.c.** - pereţi primari celulozici; **pct.v.f.** - punctuaţii observate de faţă; **pct.v.p.** - punctuaţii observate din profil (orig.)

2. Evidenţierea îngroşărilor celulozice şi a punctuaţiilor

A. Material:

- "Seminţe" de conduraşi (*Tropaeolum majus*, fam. *Tropaeolaceae*)

B. Reactivi:

Acid sulfuric 75 %

Lugol

C. Protocol experimental:

Se execută secţiuni fine prin cotiledoane, cu briciul şi se pun într-o sticlă de ceas cu apă. Apoi, se montează într-o picătură de acid sulfuric 75%, între lamă şi lamelă. Observând preparatul pus pe platina microscopului, se adaugă lugol sub lamelă şi se aspiră pe latura opusă a lamelei, cu ajutorul hârtiei de filtru, reactivul precedent. Se creează astfel un curent de lichid şi se poate observa un gradient de colorare a obiectului.

Scanned with OKEN Scanner

D. Observaţii:

Peretele celulelor ia o culoare albastră. Această culoare se dezvoltă de o parte şi de alta a lamelei mediane necolorate; ea materializează enormele îngroşări de celuloză, proprii fiecărei celule.

Pe de altă parte, canaliculele fine, ce traversează aceste îngroşări, sunt vizibile la un obiectiv puternic; acestea sunt punctuaţiile, văzute din profil. În celulele golite de conţinutul lor, se pot vedea de faţă aceste punctuaţii; ele apar ca mici "butoniere" în grosimea pereţilor, în fundul celulelor.

E. Interpretare:

Acidul sulfuric provoacă un început de hidroliză a celulozei; se formează astfel hidroceluloza, care se colorează în albastru în prezenţa iodului din lugol.

Celuloza, cu structură fibrilară, este un polimer al D-glucozei. Ea se depune sub formă de pături succesive pe lamela mediană, constituind pereţii primari şi secundari ai fiecărei celule. Vom regăsi această structură de bază pentru toţi pereţii celulelor vegetale.

Totuşi, există şi variaţii cu privire la grosimea depunerilor de celuloză, prezenţa sau absenţa punctuaţiilor şi a meaturilor intercelulare.

MEMBRANELE BIOLOGICE

Membranele biologice, plasmalema şi tonoplastul sunt constituenţi vii, care se pot pune în evidenţă graţie elasticităţii lor.

Ele joacă un rol esenţial în schimburile dintre celule şi dintre acestea şi mediul înconjurător prin cantităţile de apă care pot ieşi sau pătrunde în celulă prin fenomenul de osmoză şi prin ionii care pot sau nu să le traverseze.

Ele sunt constituite în principal din proteine şi din lipide, ce formează un mozaic cu piese mobile.

1. Evidenţierea tonoplastului

A. Material:

- Fruct (bacă) matur de lemn câinesc (*Ligustrum vulgare*, fam. *Oleaceae*)

Scanned with OKEN Scanner

B. Protocol experimental:

Se îndepărtează cu grijă epicarpul pielos al fructului. Cu un ac spatulat se prelevează material din mezocarp (imediat sub epicarp) şi se etalează bine într-o picătură de apă pe o lamă; se acoperă cu lamelă şi se observa imediat.

C. Observaţii:

Observate la microscop, celulele au formă eliptică sau neregulată şi culoare violetă datorită pigmenţilor antocianici conţinuţi în vacuolă. Celulele sunt izolate unele de altele deoarece la maturarea fructului se macerează, în mod natural, lamela mediană sau cimentul median dintre pereţii primari ai fiecărei celule.

Montând celulele în apă, care este o soluţie hipotonică, de concentraţie inferioară sucului vacuolar, are loc fenomenul de **endosmoză** (de pătrundere a apei în sucul vacuolar), ceea ce va determina mărirea volumului celular şi, respectiv, starea de *turgescenţă*. În felul acesta se observă limita vacuolei, reprezentată tocmai de **tonoplast** (Fig. 28 A).

D. Interpretare:

Turgescenţa joacă un rol important în structura şi menţinerea formei plantelor; vacuola mare, centrală, care ocupă întreg volumul celulei, datorită absorbţiei apei din jur prin fenomenul de endosmoză, presează asupra citoplasmei, care la rândul ei transmite presiunea asupra peretelui celular, iar acesta se întinde.

2. Evidenţierea plasmalemei

A. Material:

- Fruct (bacă) matur de lemn câinesc (***Ligustrum vulgare***, fam. *Oleaceae*)

B. Reactiv:

Soluţie apoasă de NaCl 8%

C. Protocol experimental:

Celule din mezocarp se etalează într-o picătură de soluţie de NaCl 8%. Montate într-o soluţie hipotonică, cu o presiune osmotică superioară faţă de cea a sucului vacuolar, are loc

Scanned with OKEN Scanner

fenomenul de **exosmoză** (ieşire a apei din vacuolă, din celulă şi trecerea acesteia în mediul ambiant); drept rezultat, datorită diferenţei de presiune osmotică are loc micşorarea volumului vacuolei şi implicit a celulei, adică celula începe să se plasmolizeze. În această stare, ca urmare a pierderii apei de către sucul vacuolar, culoarea sa devine mai intensă, datorită concentrării antocianului. În jurul vacuolei se observă un strat mai mult sau mai puţin subţire de citoplasmă în care sunt vizibile cloroplastele.

D. Observaţii şi interpretare:

Forma bine conturată pe care citoplasma o prezintă în timpul plasmolizei demonstrează existenţa unei plasmaleme elastice şi contractile, iar prezenţa cloroplastelor în interiorul citoplasmei permite mult mai clar evidenţierea ambelor pelicule citoplasmatice, plasmalema şi tonoplastul.

Plasmoliza se desfăşoară gradat: mai întâi, în faza **incipientă** sau **concavă**, are loc desprinderea citoplasmei de peretele celular, începând de la colţurile celulei (*plasmoliză concavă*), apoi se extinde treptat, trecând de la faza concavă la cea **convexă** (*plasmoliză convexă*); aceasta din urmă este marcată prin desprinderea aproape totală a citoplasmei de peretele celular vacuola prezentând forma unei mase sferice sau ovale, situată în zona centrală a celulei (Fig. 28 B).

În concluzie, prezenţa celor două pelicule plasmatice, plasmalema şi tonoplastul poate fi demonstrată cu ajutorul fenomenelor de plasmoliză şi turgescenţă a celulelor.

1". Evidenţierea plasmalemei

A. Material:

- Epiderma superioară (internă) a unei tunici mijlocii din bulbul de ceapă (***Allium cepa***, fam. *Liliaceae*)

B. Reactiv:

Soluţie apoasă de nitrat de potasiu (KNO_3) 0,8 molar

C. Protocol experimental:

Un fragment de epidermă este montat într-o picătură de reactiv, între lamă şi lamelă; se observă imediat.

Scanned with OKEN Scanner

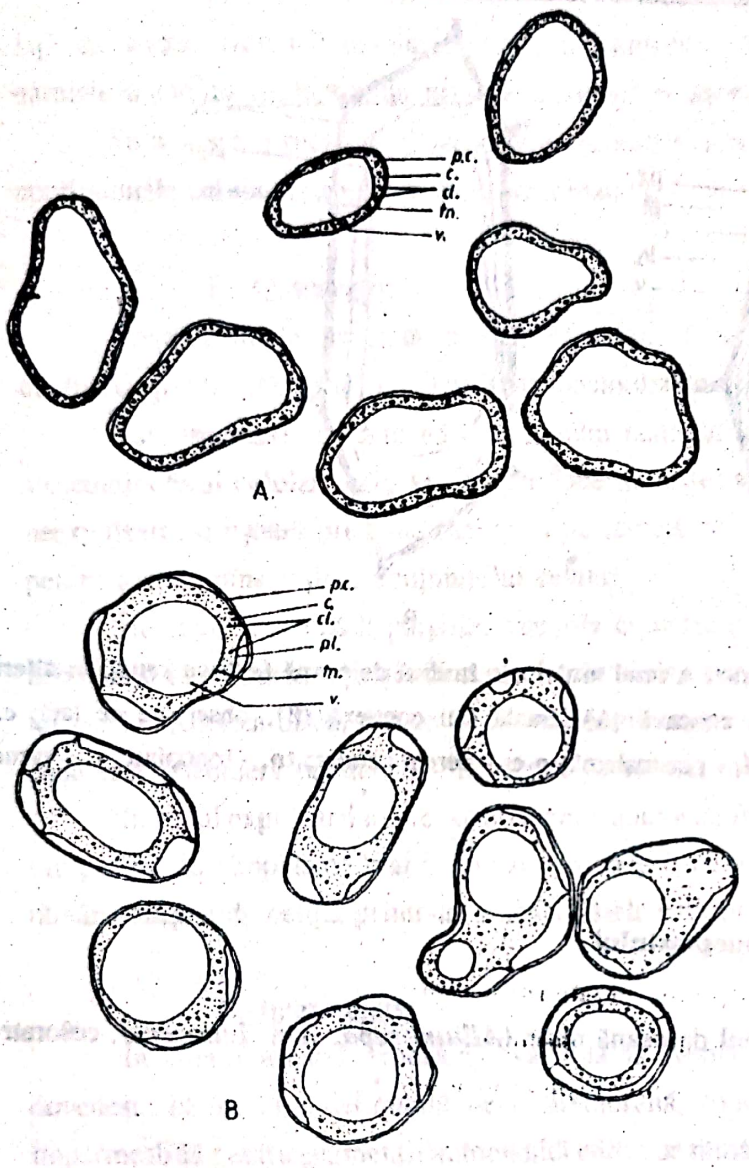


Fig. 28. Celule din mezofilul fructului de lemn câinesc (*Ligustrum vulgare*): turgescente (A), în diferite stadii de plasmoliză (B), observate de față; c. - citoplasma; cl. - cloroplaste; p - plasmalemă; p.c. - perete celular; tn. - tonoplast; v. - vacuolă (orig.)

D. Observații:

În fiecare celulă apare repede un chenar negru mai mult sau mai puțin ondulat, la anumite distanțe de perete, mai întâi la colțuri. El corespunde plasmalemei, detașată de perete. Trebuie notat că forma, ca și mărimea dezlipirilor, evoluează cu timpul; dar trebuie precizat că această membrană nu este niciodată în totalitate dezlipită de peretele scheletic. Citoplasma granuloasă, ce constituie o bandă continuă de grosime variabilă, este delimitată la exterior de plasmalemă. Dezlipirile sau spațiile situate între perete și plasmalemă sunt optic vide; ele permit a localiza cu precizie membrana plasmică, în mod normal aderentă de perete. Vacuola își micșorează progresiv volumul (Fig. 29).

E. Interpretare:

Fenomenele de plasmoliză, astfel observate, provoacă o dezlipire a plasmalemei, ceea ce o face vizibilă la microscopul optic (se va raporta la interpretarea dată, privind schimburile de apă).

Scanned with OKEN Scanner

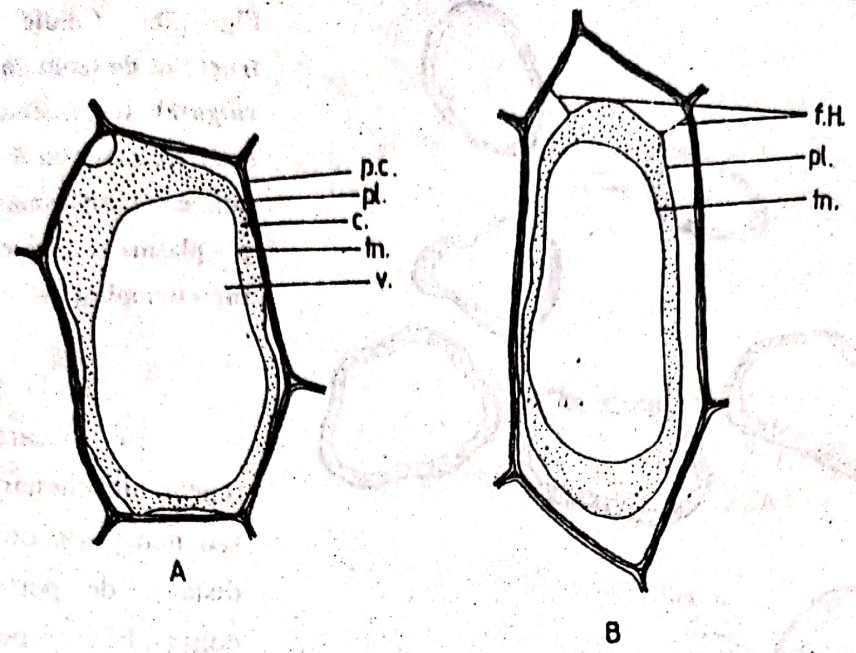


Fig. 29. Celule din epiderma superioară a unei tunici din bulbul de ceapă (*Allium cepa*), în diferite stadii de plasmoliză: incipientă sau concavă (**A**), finală sau convexă (**B**), observate de față; **c.** - citoplasmă; **f.H.** - filamente Hecht; **pl.** - plasmalemă; **p.c.** - perete celular; **tn.** - tonoplast; **v.** - vacuolă (orig.)

2". Evidențierea tonoplastului

A. Material:

● Tunici cărnoase din bulbul de ceapă roșie (***Allium cepa***, fam. *Liliaceae*), colorate în mod natural

B. Reactiv:

Soluție apoasă de nitrat de potasiu (KNO_3) molară

C. Protocol experimental:

Se fac secțiuni tangențiale printr-o tunică de ceapă (dinspre epiderma inferioară sau externă colorată), în sensul înălțimii solzului. Se imersează într-o sticlă de ceas cu o soluție de KNO_3, timp de o oră. Secțiunile cele mai subțiri sunt puse, pe uscat, pe o lamă, fără lamelă.

Pe platina microscopului, la un măritor slab, se reperează sensul de alungire a celulelor.

Pe lamă, cu ajutorul unei lame de ras, se taie bucăți din epidermă, în sens perpendicular

Scanned with OKEN Scanner

față de sensul alungirii celulare determinat anterior. Se operează atunci mai multe tăieturi paralele unele cu altele, având grija de a îndepărta ușor diferitele bucăți obținute.

Se adaugă o picătură de reactiv și se acoperă lama cu o lamelă. Celulele secționate și conținuturile celulare expulzate sunt examinate.

D. Observații:

Toate celulele prezintă o vacuolă colorată în roșu datorită pigmenților antocianici conținuți; pe de altă parte, celulele sunt plasmolizate.

Este interesant de a urmări, la nivelul celulelor secționate, expulzări parțiale sau totale ale conținutului celular, care se vor produce de altfel spontan în mediul de montaj. În caz de neexpulzare, o ușoară presiune (apăsare) pe lamelă cu ajutorul unui ac spatulat, este suficientă pentru a determina ieșirea conținutului celular.

În cursul expulzării parțiale, vacuola colorată și înconjurată de citoplasma granuloasă, necolorată este adesea reținută în centrul celulei de către tractusurile citoplasmatice, filamentele lui Hecht. Acestea devin din ce în ce mai colorate, în timp ce vacuola, de formă mai alungită când este prizoniera celulei, devine din ce în ce mai rotundă când iese în mediul de montaj.

În cazul expulzării totale, se observă vacuole de formă rotundă, colorate, înconjurate total sau parțial de citoplasmă mai mult sau mai puțin dezagregată. Notăm că anumite vacuole pot rămâne atașate de celulă printr-un tractus foarte subțire care nu s-a rupt încă (Fig. 30).

E. Interpretare:

În cursul acestei experiențe vacuola ia formă rotundă la exteriorul celulei. Aceasta dovedește că ea este delimitată de o membrană, tonoplastul. Această membrană, vie, este impermeabilă pentru pigmenții antocianici care vor rămâne deci pe loc și nu vor migra în mediul de montaj.

Fenomenele de plasmoliză au permis de a scoate protoplastul celular, adică tot materialul viu: vacuolă, citoplasmă, nucleu. În majoritatea cazurilor vacuola rămâne intactă în mediul exterior, tăierea epidermei fiind realizată la nivelul dezlipirilor plasmalemei de perete. Uneori secțiunea trece prin vacuole, care se sparg; antocianii s-au răspândit în mediul de montaj și celulele s-au golit atunci de conținutul lor.

Membranele biologice (simple), datorită faptului că sunt vii, se pot pune în evidență în cursul acestor experiențe.

Scanned with OKEN Scanner

În celulele moarte, îndeosebi fixate, ele nu mai joacă nici un rol fiziologic. De aceea trebuie să verificăm totdeauna, în cursul observaţiilor, starea celulelor înainte de a întreprinde experimentul; ştim, deja, că cicloza este un criteriu al vieţii celulei.

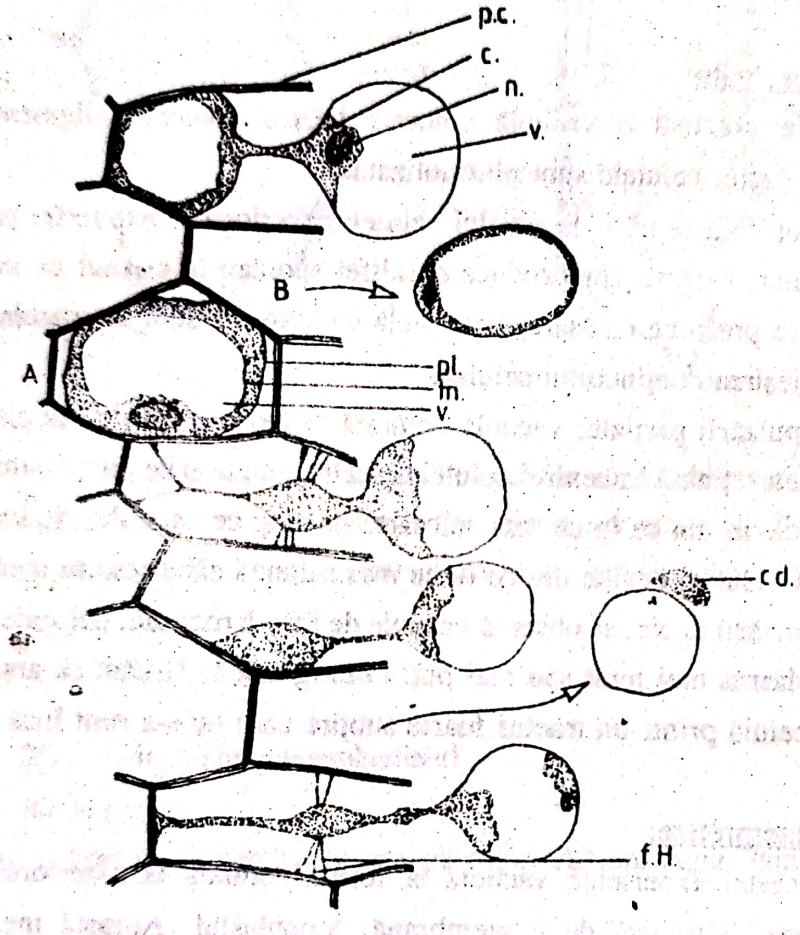


Fig. 30. Celule din epiderma superioară a unei tunici din bulbul de ceapă (*Allium cepa*): evidenţierea plasmalemei şi tonoplastului într-o celulă plasmolizată **(A)**, într-un protoplast **(B)**, observate de faţă; **c.** - citoplasmă; **c.d.** - citoplasmă dispersată; **f.H.** - filamente Hecht; **n.** - nucleu; **pl.** - plasmalemă; **p.c.** - perete celular; **tn.** - tonoplast; **v.** - vacuolă (d. Savouré şi Verger-Lagadec)

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL III

CITOPLASMA

Hialoplasma constituie masa fundamentală a celulei, de prezenţa ei fiind legată existenţa tuturor structurilor celulare vii (organite, ribozomi, microtubuli, microfilamente), multiplu conexate fizic, chimic şi biologic, elemente cu care hialoplasma formează o unitate morfo-funcţională indestructibilă - citoplasma.

La microscopul fotonic ea apare ca o substanţă omogenă, hialină, diafană, monorefrigerentă, optic vidă. Este delimitată înspre perete de plasmalemă şi înspre vacuolă de tonoplast. Este deci un mediu omogen (citosol), în care se găsesc organite vizibile, de volum variabil. În celulele vii ea joacă un rol important în activitatea metabolică a acestora, fiind caracterizată printr-o perpetuă mişcare.

Mişcările (curenţii) citoplasmei

Citoplasma, care este sediul unor importante procese biochimice ale metabolismului celular, se află în continuă mişcare în celula vegetală.

A. Material:

- Tulpină foliată de ciuma apelor (***Elodea canadensis***, fam. *Hydrocharitaceae*)
- Flori proaspete de telegraf (***Tradescantia discolor***, fam. *Commelinaceae*), recoltate cu aproximativ o oră înainte de efectuarea preparatului

B. Protocol experimental:

- Se procedează ca în cazul observării celulelor clorofiliene (a se vedea **Capitolul II - ORGANIZAREA GENERALĂ A CELULEI VEGETALE**: *Principalii constituenţi celulari*)
- Se desprind perii de pe filamentele staminelor florii de telegraf şi se pun pe lamă, într-o picătură de apă, sub lamelă.

C. Observaţii:

- Ciuma apelor este o plantă superioară, acvatică submersă. Frunzele, fiind alcătuite numai din două straturi de celule (cu valoare de epiderme: inferioară şi superioară) pot fi

Scanned with OKEN Scanner

observate prin transparență la microscop. Inițial, mișcarea este mai activă în celulele situate de-a lungul nervurii mediane a frunzei; apoi, treptat în toate celulele asimilatoare, realizându-se de jur împrejurul pereților celulari. Curenții citoplasmatici sunt orientați într-o celulă într-un sens, iar în celula vecină, de obicei, în sens contrar; aceasta este *mișcarea (cicloza) de rotație* (Fig. 31).

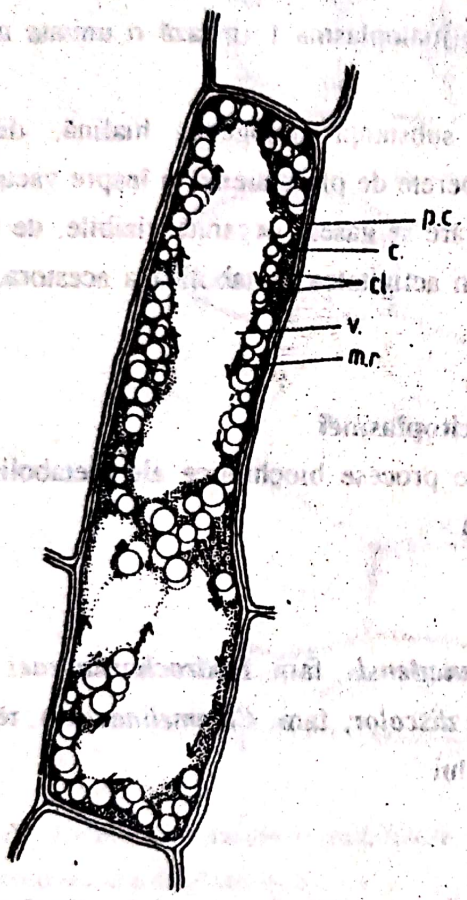


Fig. 31. Cicloza de rotație a citoplasmei într-o celulă din frunza de ciuma apelor (*Elodea canadensis*), observată de față; **c.** - citoplasmă; **cl.** - cloroplaste; **m.r.** - mișcare de rotație; **p.c.** - perete celular; **v.** - vacuolă (orig.)

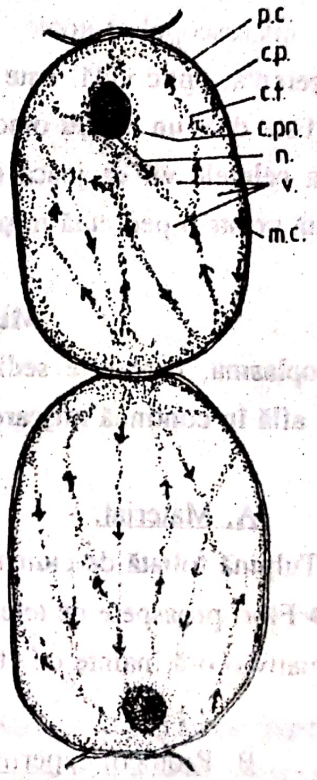


Fig. 32. Cicloza de circulație a citoplasmei în celule ale perilor staminali de telegraf (*Tradescantia discolor*), observate de față; **c.p.** - citoplasmă parietală; **c.t.** - citoplasmă trabeculară; **c.pn.** - citoplasmă perinucleară; **m.c.** - mișcare de circulație; **n.** - nucleu; **p.c.** - perete celular; **v.** - vacuole (orig.)

Scanned with OKEN Scanner

●● Un păr staminal apare format, din mai multe celule dispuse cap la cap, cu strangulări la zonele de contact. Culoarea perilor staminali este uşor violetă datorită vacuolelor care conţin pigmenţi antocianici. La un obiectiv puternic se observă curenţii citoplasmatici, în cordoanele plasmatice care separă vacuolele, realizându-se în sensuri diferite; aceasta este *mişcarea (cicloza) de circulaţie*. După un timp relativ scurt de la montarea preparatului, curenţii citoplasmatici se opresc, filamentele plasmatice se dezorganizează, protoplastul se desprinde de peretele celular şi se contractă, iar în final celula moare (Fig. 32).

D. Interpretare:

Mişcarea intracelulară a citoplasmei este una din proprietăţile fiziologice ale materiei vii; ea apare ca rezultat al reacţiilor chimice ce se petrec în diversele zone fiziologice ale celulei.

În general, mişcările citoplasmei - cunoscute sub numele de **cicloză** sau **dineză** - au loc în mod diferit şi depind de grupul de plante, de organul, precum şi de tipul de celulă. Se cunosc mai multe tipuri de mişcări citoplasmatice, dintre care două sunt mai importante: **cicloza de rotaţie şi cicloza de circulaţie.**

Cicloza de rotaţie este caracteristică celulelor adulte, cu o singură vacuolă mare, cu poziţie centrală; are loc mai ales în citoplasma parietală, fiind una din mişcările cele mai ordonate ale citoplasmei.

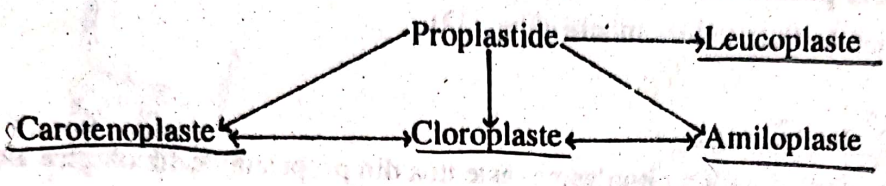
Cicloza de circulaţie este caracteristică celulelor tinere, cu mai multe vacuole, putându-se observa în filamentele citoplasmatice dintre vacuole. În acest caz, curenţii citoplasmatici au viteze şi sensuri diferite; spre deosebire de cicloza de rotaţie, acest tip de mişcare are un caracter periodic, în sensul că direcţia se schimbă alternativ. În fiecare filament spre centrul celulei şi din mijlocul acesteia spre zona parietală a citoplasmei.

Organite citoplasmatice

♦ **Mitocondriile** sunt organite de dimensiuni variabile (0,3-5 μm), de forme diferite (sfere, bastonaşe). Numărul lor depinde de talia celulelor, ele reprezentând 20% din substanţa celulară. Ele joacă un rol important la nivelul respiraţiei celulare, fiind sediul sintezei de molecule de ATP (adenosintrifosfat), molecule bogate în energie, utilizabile pe loc. De asemenea, pot sintetiza anumite proteine; fenomene de schimburi şi de reglare a metabolismului există între mitocondrii şi hialoplasmă.

Scanned with OKEN Scanner

♦ **Plastidele** sunt organite caracteristice celulei vegetale, capabile să realizeze sinteza anumitor compuşi. Ele au ca origine proplastide localizate în celulele ţesuturilor meristematice. După tipurile celulare, condiţiile mediului extern, starea lor fiziologică în cursul dezvoltării, ele se prezintă sub diferite aspecte:



Notăm că, plastidele diferenţiate pot fi la originea altor tipuri de plastide în funcţie de condiţiile mediului înconjurător.

♦ **Cloroplastele** conţin în principal pigmenţii verzi: clorofilele. Ele au formă de discuri lenticulare de 3-10 μm diametru şi 1-2 μm grosime. Numărul lor este variabil; ele sunt mai numeroase la plantele superioare decât la alge. Se găsesc în principal în celulele ţesuturilor expuse la lumină. Ele prezintă o importanţă deosebită datorită capacităţii lor de a efectua fotosinteza; graţie clorofilei a şi utilizând energia luminoasă, ele reduc astfel gazul carbonic (CO_2) la compuşi organici (glucide). Ecuaţia globală este următoarea:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{h\nu} (CH_2O) + O_2\uparrow + E\ (112\ Kcal)$$

(CH_2O) desemnează o verigă din lanţul glucidic.

Acest proces fiziologic asigură autotrofia plantelor. Pe de altă parte, ele pot, de asemenea, sintetiza proteine în masa lor fundamentală numită stromă. Aceste două funcţii esenţiale nu pot să se desfăşoare decât dacă există schimburi de metaboliţi între cloroplast şi hialoplasmă.

♦ **Carotenoplastele** sunt, ca şi cloroplastele, plastide colorate, ce conţin mai ales pigmeţi carotenoizi; se găsesc în ţesuturile florilor, fructelor, dar şi a! unor tulpini, rădăcini, seminţe. Pigmenţii se află fie în stare dizolvată în lipide formând plastoglobuli, fie se prezintă sub formă de cristale (licopenul, carotenul). Carotenoplastele pot proveni prin interconversie, din cloroplastele preexistente (de ex. în pulpa bacei de tomate). Ele asigură, indirect, prin culorile lor vii, atrăgând insectele şi pasările, fecundaţia florilor şi diseminarea seminţelor.

♦ **Amiloplastele** sunt plastide necolorate, prezente în organele de rezervă ale plantelor: rădăcini, tuberculi, rizomi, seminţe, fructe ş.a. Ele elaborează amidon, plecând de la glucide

Scanned with OKEN Scanner

solubile, fie în proplastide (care, în acest caz, îşi măresc volumul), fie în leucoplaste. Amidonul este în general structurat; el este format din amiloză (20-30 %) şi din amilopectină (70-80 %), substanţe constituite din molecule de α-D-glucopiranoză, dispuse în lanţuri simple (amiloză) şi în lanţuri ramificate (amilopectină). Acest amidon este utilizat în momentul dezvoltării plantei; el este atunci hidrolizat în glucoză, care migrează în diferite ţesuturi, în special acelea ale mugurilor şi seminţelor.

♦ **Nucleul** este cel mai voluminos organit din celulă. Rolul său este deosebit de important: conţine cromozomi (care, în cursul diviziunilor celulare, se separă fiecare în două subunităţi identice, cromatidele), purtătorii informaţiei genetice. Aceasta este duplicată (replicată) şi distribuită în celule fiice, de către cromozomii-fii formaţi. Diviziunea (mitoza) duce la formarea a două celule diploide. În cadrul fiecărui ciclu de reproducere sexuată, mitoza este precedată de meioză, în cursul căreia cromatidele se recombină între ele şi suferă o reducere cromatică, ceea ce conduce la formarea de celule haploide.

Fiecare nucleu cuprinde două perioade în existenţa sa: o fază de repaus, când el este cuiescent (în aşteptare); o fază de diviziune, când el poate suferi o mitoză (celule somatice) sau o meioză şi o mitoză (celule sexuale).

1. Condriomul (totalitatea mitocondriilor dintr-o celulă)

A. Material:

- Epiderma superioară (internă) a unei tunici mijlocii din bulbul de ceapă (*Allium cepa*, fam. *Liliaceae*)

B. Reactiv:

Verde Janus, soluţie 0,001 %

C. Protocol experimental:

Fragmente din epiderma superioară, se imersează în reactivul aflat într-o sticlă de ceas, timp de 30 de minute. Se acoperă totul cu o altă sticlă de ceas pentru a evita evaporarea lichidului. Fragmentele de ţesut sunt apoi montate în verde Janus.

Scanned with OKEN Scanner

D. Observații:

Se reperează o celulă vie (care prezintă cicloză). La un măritor puternic, observația se face asupra citoplasmei, acolo unde ea este cea mai densă: citoplasma parietală de la colțurile celulei, citoplasma perinucleară de unde pleacă trabecule. Ea apare granuloasă datorită existenței în interiorul ei a unor organite mici, mitocondriile, care apar colorate în verde deschis și sunt antrenate de mișcările hialoplasmei. Acestea provoacă la nivelul citoplasmei o deformare spectaculoasă (în special în trabecule) (Fig. 33).

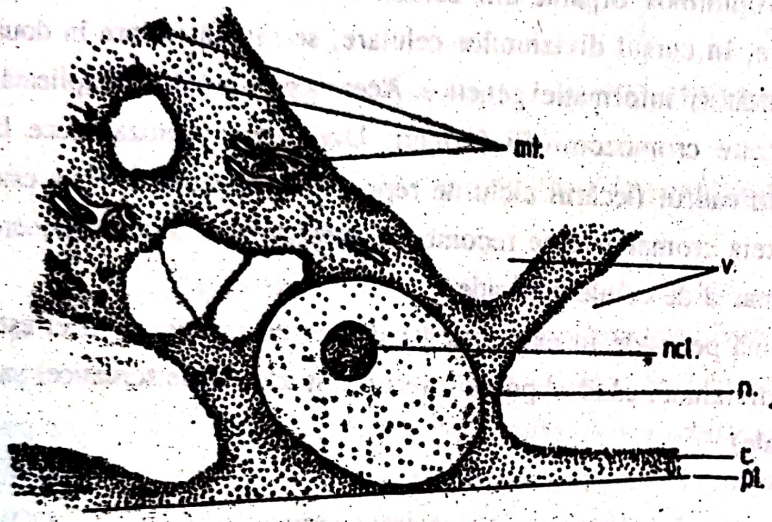


Fig. 33. Mitocondrii din zona perinucleară, într-o celulă din epiderma superioară a unei tunici din bulbul de ceapă (*Allium cepa*), observată de față; **c.** - citoplasmă; **m.t.** - mitocondrii; **n.** - nucleu; **ncl.** - nucleol; **pl.** - plasmalemă; **v.** - vacuole (d. Savouré și Verger-Lagadec)

E. Interpretare:

Verdele Janus este un reactiv albăstrui care colorează mitocondriile în verzui (colorant metacromatic). În celulă el se poate prezenta sub două forme: o formă oxidată, verde, la nivelul mitocondriilor și o formă neoxidată (leucoderivată), incoloră, la nivelul hialoplasmei.

Mitocondriile, bogate în oxidaze, mențin colorantul sub forma sa oxidată, în timp ce la nivelul altor structuri celulare ale hialoplasmei el este sub forma sa redusă.

2. Plastidomul (totalitatea plastidelor dintr-o celulă)

Se studiază patru tipuri principale de plastide: amiloplaste, cloroplaste, carotenoplaste și leucoplaste, ca și exemple de transformare a plastidelor (amiloplaste în cloroplaste, cloroplaste în carotenoplaste).

Scanned with OKEN Scanner

1°. *Amiloplastele*

Studiu în rizomul de stânjenel

1. Observaţie vitală

A. Material:

● Fragment proaspăt din rizomul de stânjenel (***Iris germanica***, fam. ***Iridaceae)***, prelevat din vecinătatea mugurului terminal

B. Reactiv:

Soluţie de zaharoză 5 %

C. Protocol experimental:

Se efectuează, cu briciul, secţiuni tangenţiale subţiri, la nivelul elementelor conducătoare din rizom. În secţiune transversală, acestea apar sub formă de mici pete galben-verzui, dispuse la o anumită distanţă de zona suberoasă externă. Secţiunile sunt puse într-o sticlă de ceas cu reactiv şi cele mai fine sunt montate în acelaşi reactiv, între lamă şi lamelă.

D. Observaţii:

La un măritor puternic, în hialoplasma celulelor cu pereţi neregulat îngroşaţi şi bogaţi în punctuaţii şi meaturi, apar elemente ovale, alungite, refringente; acestea sunt granulele de amidon elaborate de amiloplaste şi situate în interiorul acestora. Aceste plastide sunt complete, atunci când este posibil să le vedem, acoperind parţial amidonul - o calotă granuloasă, gălbuie, formată de substanţa plastidială groasă. Volumul acestei calote diferă de la o plastidă la alta după vârstă. În sfârşit, o anvelopă foarte fină înconjoară fiecare amiloplast (Fig. 34).

E. Interpretare:

Amidonul se depune în interiorul fiecărui amiloplast în mod excentric, în aşa fel că o parte din substanţa fundamentală sau substanţa plastidială se prezintă sub forma unei calote groase şi fin granuloasă. Observarea mai multor celule poate permite să asistăm la diferite faze ale dezvoltării amiloplastului; aproape de elementele conducătoare, plastida, mică, poate conţine sau nu amidon; amiloplastul apare atunci granulos, de formă rotunjită; nu observăm în acest caz

Scanned with OKEN Scanner

decât substanţă plastidială înconjurată de o anvelopă (membrană dublă). În alte celule, amidonul începe să apară ca o incluziune refringentă, substanţa plastidială fiind încă relativ voluminoasă. Puţin câte puţin, granula de amidon creşte în jurul hilului (în formă de accent circumflex); volumul său creşte; substanţa plastidială este localizată la unul din poli: observăm în acest caz un amiloplast adult. După un anumit timp de observaţie şi din cauza fragilităţii acestui material se produce ruptura membranei plastidiale, cu tot montajul în soluţie de zaharoză; granula de amidon este eliberată din amiloplast; substanţa plastidială este atunci dezagregată şi se prezintă sub forma unei grămezi de granulaţii animate de mişcări browniene.

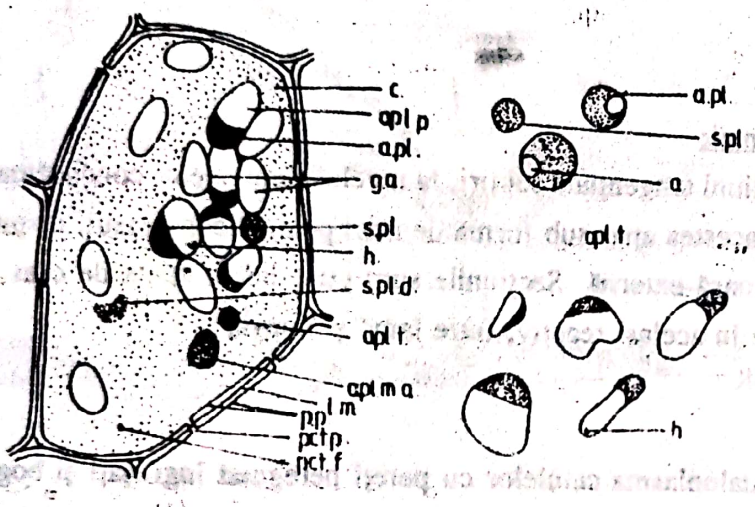


Fig. 34. Amiloplaste într-o celulă parenchimatică din rizomul de stânjenel (*Iris germanica*), secţiune transversală; **a.pl.** - anvelopă plastidială; **apl.m.a.** - amiloplast matur, văzut apical; **apl.p.** - amiloplast, văzut din profil; **apl.t.** - amiloplast tânăr; **c.** - citoplasmă; **g.a.** - granule de amidon; **h.** - hil; **l.m.** - lamelă mediană; **p.p.** - pereţi primari; **pct.f.** - punctuaţii, văzute de faţă; **pcr.p.** - punctuaţii, văzute din profil; **s.pl.** - substanţă plastidială; **s.pl.d.** - substanţă plastidială dispersată (d. Savouré şi Verger-Lagadec)

2. Coloraţia amiloplastelor

A. Material:

• Fragment proaspăt din rizomul de stânjenel (*Iris germanica*, fam. *Iridaceae*) prelevat din vecinătatea mugurului terminal (a se vedea protocolul experimental de la 1. *Observaţie vitală*)

B. Reactivi:

Soluţie de zaharoză 5%

Lugol

C. Protocol experimental:

Câteva secţiuni fine sunt montate în zaharoză, între lamă şi lamelă. Se trece apoi progresiv, sub lamelă, lugol. Se opreşte adăugarea de reactiv când coloraţia albastră nu este

vizibilă decât sub jumătate din suprafaţa lamelei. Se reperează la un măritor puternic, amiloplaste colorate.

D. Observaţii:

Protocolul experimental indicat mai sus ne permite a observa un gradient de coloraţie: acţiunea lugolului pune în evidenţă granule de amidon colorate în albastru-violet şi calote plastidiale necolorate.

E. Interpretare:

Lugolul este un colorant specific al amidonului; iodul colorează mai ales unul din constituenţii lui principali: amiloza.

Studiu în tuberculul de cartof

1. Observaţie vitală

A. Material:

- Tubercul de cartof (***Solanum tuberosum***, fam. ***Solanaceae***)

B. Reactiv:

Soluţie de zaharoză 5%

C. Protocol experimental:

Se îndepărtează periderma de la periferia tuberculului; se răzăluieşte, cu ajutorul unui ac spatulat, parenchimul gălbui al tuberculului. Produsul este montat în reactiv, între lamă şi lamelă (Fig. 35 A).

D. Observaţii:

Amiloplastele sunt izolate în mediul de montaj. Se pot distinge trei tipuri de amiloplaste: simple (cele mai frecvente), semicompuse şi compuse (mai rare).

În aceste plastide, granula sau granulele de amidon ocupă totalitatea volumului amiloplastului; în consecinţă, substanţa plastidială este extrem de redusă şi anvelopa plastidială pare lipită direct de granula de amidon; acesta din urmă prezintă linii concentrice ce reprezintă linii de separaţie a depunerilor succesive de amidon sau *straturi* (striuri). Ele au ca punct de

Scanned with OKEN Scanner

plecare o pată întunecată, punctiformă, centrică sau excentrică: este *hilul*, zonă a primei depuneri de amidon.

Amiloplastul simplu conţine o singură granulă de amidon; cel semicompus elaborează mai mult de o granulă de amidon, fiecare având un hil propriu, aceste granuln fiind toate formate într-un singur amiloplast; **amiloplastul compus** este constituit din două sau trei amiloplaste distincte, alipite unele de altele printr-o zonă de contact densă, care apare negricioasă (Fig. 35 B-D).

E. Interpretare:

Fiecare pătură sau strat de amidon, compusă din amiloză (20 - 25%) şi din amilopectină (75 - 80%), corespunde unui depuneri de amidon în timp de 24 de ore. Liniile concentrice, vizibile la microscop separă diferitele pături.

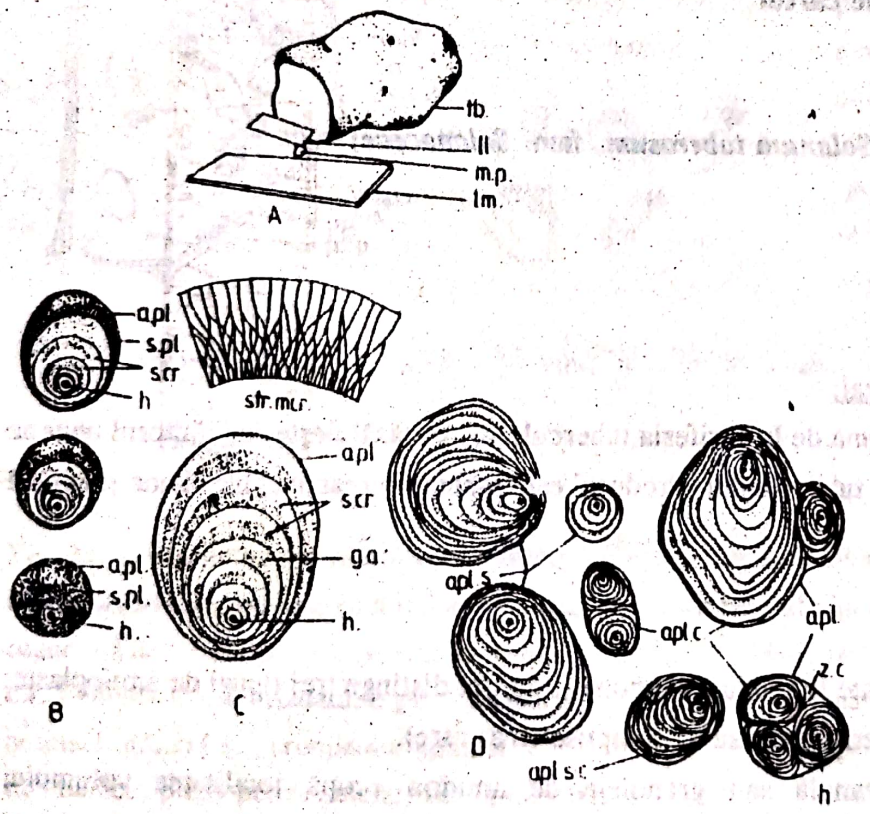


Fig. 35. Amiloplaste din celule parenchimatice ale tuberculului de cartof (*Solanum tuberosum*): obţinerea preparatului (A), formarea (B), structura (C), tipurile de amiloplaste (D); **a.pl.** - anvelopă; **apl.c.** - amiloplaste compuse; **apl.s.** - amiloplaste simple; **apl.s-c.** - amiloplaste semicompuse; **g.a.** - granul de amidon; **h.** - hil; **ll.** - lamelă; **lm.** - lamă; **m.p.** - material prelevat; **s.cr.** - straturi de creştere; **s.pl.** - substanţă plastidială; **str.mcr.** - structură microcristalină; **tb.** - tuberculi de cartof; **z.c.** - zonă de contact (d. A - Braune şi colab.; B, C - Atabekova şi Ustinova; D - Centova)

Scanned with OKEN Scanner

2. *Coloraţia amiloplastelor*

A. Material:

- Se utilizează preparatul precedent

B. Reactiv:

Lugol

C. Protocol experimental:

Se trece lugol sub lamelă, pentru a observa gradientul de colorare (a se vedea Studiu în rizomul de stânjenel)

D. Observaţii:

Granula de amidon, practic singura vizibilă, este colorată în violet; striurile de creştere apar net dacă coloraţia nu este prea pronunţată.

E. Interpretare:

Lugol este colorantul specific al amidonului, colorându-l în violet.

2°. *Cloroplastele*

Studiul cromatoforilor la algele verzi

A. Material:

- Talul algei mătasea broaştei (*Spirogyra sp.*, fam. *Zygnemaceae*)
- ●● Talul algei lâna broaştei (*Cladophora sp.*, fam. *Cladophoraceae*).

B. Protocol experimental:

Câteva filamente ale acestor alge, se montează succesiv într-o picătură de apă, între lamă şi lamelă.

C. Observaţii:

- Mătasea broaştei este o algă verde cu tal filamentos pluricelular, neramificat, uniseriat;

Scanned with OKEN Scanner

în interiorul celulelor cilindrice, dispuse cap la cap se observă cromatofori sub formă de panglică spiralată, cu marginile puternic lobate. Pe cromatofori se observă granulaţii proteice, sferice, încojurate de amidon granular; aceste formaţiuni se numesc *pirenoizi*. În unele celule, la o mărire puternică se poate distinge şi nucleul înconjurat de citoplasmă, localizat parietal sau central (Fig. 36).

●● Lâna broaştei este o algă verde cu tal filamentos pluricelular, ramificat; celulele plurinucleate conţin un cromatofor reticulat, sub formă de cilindru perforat sau reţea parietală. Pe cromatofor se pot observa din loc în loc *pirenoizi* (Fig. 37).

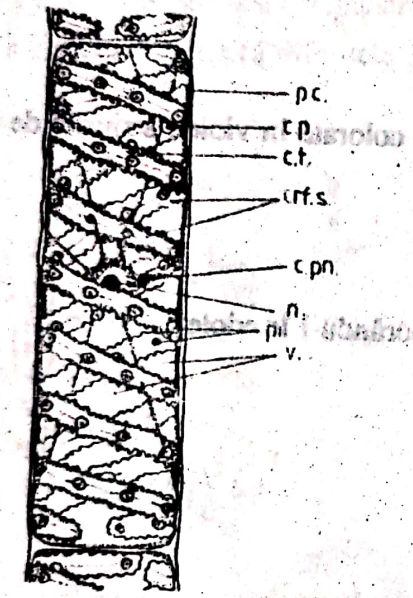


Fig. 36. Cromatofor spiralat într-o celulă a talului algei mătasea broaştei (*Spirogyra* sp.), observată de faţă; **c.p.** - citoplasmă parietală; **c.t.** - citoplasmă trabeculară; **c.pn.** - citoplasmă perinucleară; **crf.s.** - cromatofor spiralat; **n.** - nucleu; **p.c.** - perete celular; **pi.** - pirenoizi; **v.** - vacuole (orig.)

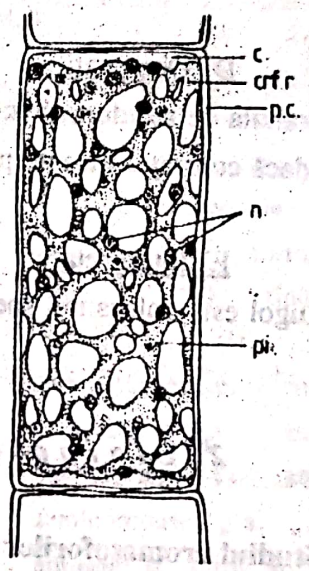


Fig. 37. Cromatofor reticulat într-o celulă a talului algei lâna broaştei (*Cladophora* sp.), observată de faţă; **c.** - citoplasmă; **crf.r.** - cromatofor reticulat; **n.** - nucleu; **p.c.** - perete celular; **pi.** - pirenoizi (orig.)

Scanned with OKEN Scanner

D. Interpretare:

La plantele inferioare, cloroplastele sunt denumite **cromatofori** şi au o formă extrem de variată; de obicei sunt mari, iar numărul lor într-o celulă este mic (1-7).

Studiul cloroplastelor la plantele superioare

1. Observaţie vitală

A. Material:

- Frunze proaspete de ciuma apelor (***Elodea canadensis***, fam. *Hydrocharitaceae*).

B. Protocol experimental:

Se detaşează o frunză cu ajutorul pensei şi se montează în apă, între lamă şi lamelă.

C. Observaţii:

Frunza are două straturi de celule. Acestea conţin organite verzi: cloroplastele. La nivelul axei mari a frunzei, celulele sunt lungi şi drepte; ele constituie "nervura". La acest nivel se observă cel mai bine cicloza care determină deplasarea cloroplastelor. Celelalte celule sunt mai mici; în ele se observă adesea cloroplaste în diviziune, prin segmentare (îndeosebi la nivelul celulelor zonelor marginale ale frunzei). Notăm că granele sunt dificil de observat în acest tip de material vegetal (Fig. 38).

D. Interpretare:

Plastidele verzi - **cloroplastele** - de la plantele superioare sunt sferice, discoidale, ovale sau lenticulare; sunt mici şi în număr foarte mare.

Mişcările citoplasmatice, care antrenează cloroplastele, se datoresc deplasării hialoplasmei; ele sunt mai întâi lente, apoi devin din ce în ce mai rapide: într-adevăr, iluminarea microscopului provoacă şi o încălzire progresivă a preparatului; viteza deplasării atinge cele mai înalte valori la o temperatură de aproximativ 35° C; dimpotrivă, ea este foarte slabă spre 50° C.

2. Coloraţia cloroplastelor

A. Material:

- Frunze proaspete de ciuma apelor (***Elodea canadensis***, fam. *Hydrocharitaceae)*

B. Reactiv:

Lugol

Scanned with OKEN Scanner

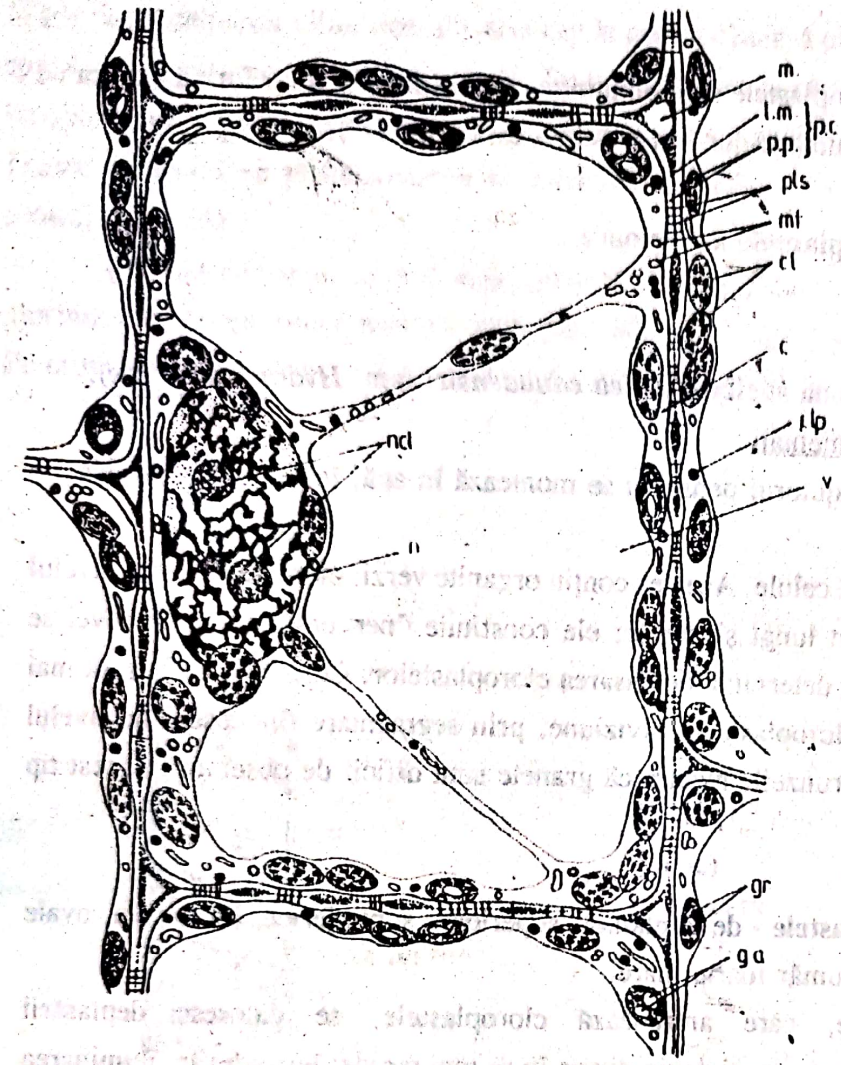


Fig. 38. Cloroplaste într-o celulă din frunza de ciuma apelor (*Elodea canadensis*), observată de față: **c.** - citoplasmă; **cl.** - cloroplaste; **g.a.** - granule de amidon; ; **gr.** - grane; **l.lp.** - incluziuni lipidice; **l.m.** - lamelă mediană; **m.** - meat; **mt.** - mitocondrii; **n.** - nucleu; **ncl.** - nucleol; **p.c.** - perete celular; **p.p.** - pereți primari; **pls.** - plasmodesme; ; **v.** - vacuolă (d. Buvat)

C. Protocol experimental:

Se imersează o frunză în reactiv, timp de 5 minute. Se spală, apoi se montează în apă, între lamă și lamelă.

D. Observații:

În celule mișcările citoplasmei s-au oprit. Reactivul colorează în galben hialoplasma și organitele ei, între care cloroplastele; în masa fundamentală sau stroma gălbuie apar bastonașe sau pete de culoare brună.

E. Interpretare:

Lugolul a fixat celulele; cicloza nu mai are loc. Pe de altă parte, acest fixator colorează în galben substanțele albuminoase ale celulei. Coloratia brună observată (necaracteristică) a cloroplastelor privește amidonul fotosintetic.

Scanned with OKEN Scanner

3° *Carotenoplastele*

Studiu în fructul de tomate

Observaţie vitală

A. Material:

- Fruct (bacă) de tomate (***Lycopersicum esculentum,*** fam. *Solanaceae*)

B. Protocol experimental:

Se ia cu ajutorul unui ac spatulat, din mezocarpul fructului, imediat sub epicarp, puţină pulpă galben-oranj; această coloraţie este intensă aproape de peduncul. Fragmentul de pulpă este etalat pe o lamă, la uscat, apoi se acoperă cu o lamelă. Dacă preparatul prezintă multe bule de aer, se poate pune apă sub lamelă.

C. Observaţii:

La o mărire mijlocie, celulele apar adesea disociate unele de altele, datorită dispariţiei cimentului pectic al peretelui; ele sunt deci limitate numai de peretele celulozic. Se alege o celulă în stare izolată, având un conţinut net. În hialoplasma fin granuloasă şi foarte dispersată se remarcă formaţiuni sferice, incolore conţinând pete roşietice: acestea sunt carotenoplastele. În citoplasma perinucleară, formaţiunile sunt numeroase; aceasta este o zonă de ales pentru o observaţie corectă. Aici ele se prezintă adesea sub diferite aspecte. Când conţinutul lor este dens, substanţa plastidială incoloră (stroma) este fin granuloasă; ea conţine atunci bastonaşe roşietice, care nu sunt altceva decât cristale de licopen. Fiecare carotenoplast este înconjurat de o anvelopă (membrană dublă) plastidială. Dacă nucleul este alterat, carotenoplastele sunt în curs de degenerare; în stroma lor apar zone negranuloase ce corespund "veziculelor". În acest caz, cristalele de licopen, voluminoase, au formă de ace care străpung membrana plastidei; ele se găsesc atunci dispersate în hialoplasmă, stroma devenind "optic" vidă.

Precizăm că pentru a testa diferitele stări ale carotenoplastelor din baca de tomate, e le bine să facem mai multe prelevări ţinând seama de starea de maturitate a mezocarpului fructului (Fig. 39).

D. Interpretare:

Licopenul, substanţa sintetizată în carotenoplastele fructului de tomate, se prezintă mai

întâi sub formă de cristale mici; acestea îşi măresc volumul şi devin ace de talie relativ mare. Reamintim că licopenul este un pigment carotenoid.

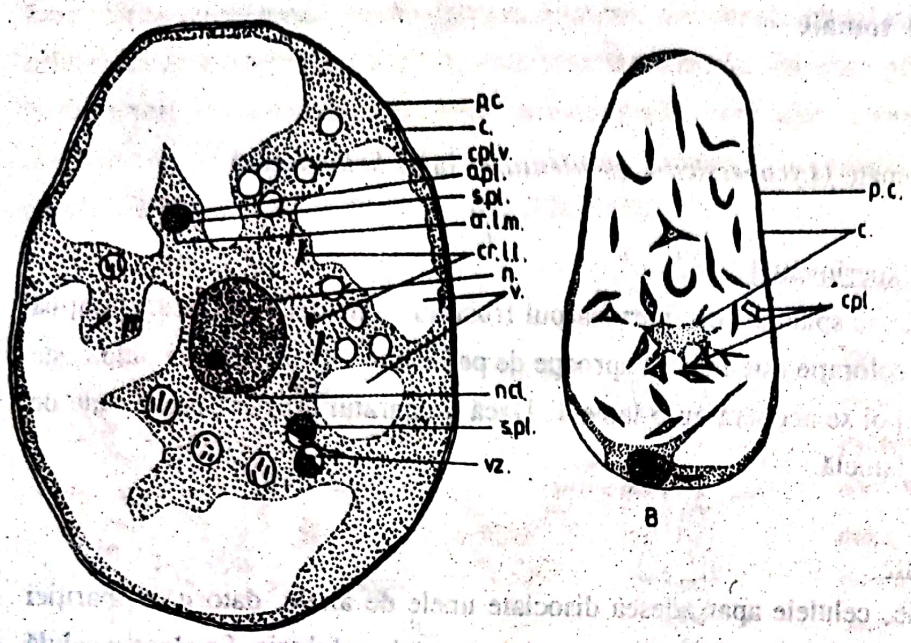


Fig. 39. Carotenoplaste în celule din fructul de tomate (*Lycopersicum esculentum*): tânăr (A), matur (B), observate de faţă; a.pl. - anvelopă plastidială; c. - citoplasmă; cpl. - carotenoplaste; cpl.v. - carotenoplaste vide; cr.l.m. - cristale de licopen mici; cr.l.l. - cristale de licopen libere în citoplasmă; n. - nucleu; ncl. - nucleol; p.c. - perete celular; s.pl. - substanţă plastidială; v. - vacuolă; vz. - "vezicule" (d. A-Savouré şi Verger-Lagadec; B - Filipescu şi Moţiu)

Studiu în rădăcina de morcov

Observaţie vitală

A. Material:

- Rădăcină tuberizată de morcov (*Daucus carota*, fam. *Apiaceae*)

B. Protocol experimental:

Se efectuează secţiuni transversale subţiri în zona corticală periferică a rădăcinii tuberizate şi se montează într-o picătură de apă, între lamă şi lamelă.

C. Observaţii:

În celulele de formă poligonală ale parenchimului de depozitare, se disting în citoplasmă, carotenoplaste în cea mai mare parte aciculare, libere ori înconjurate de un strat subţire de stromă; uneori, cristalele sunt prismatice, de culoare galben-portocalie (Fig. 40).

Scanned with OKEN Scanner

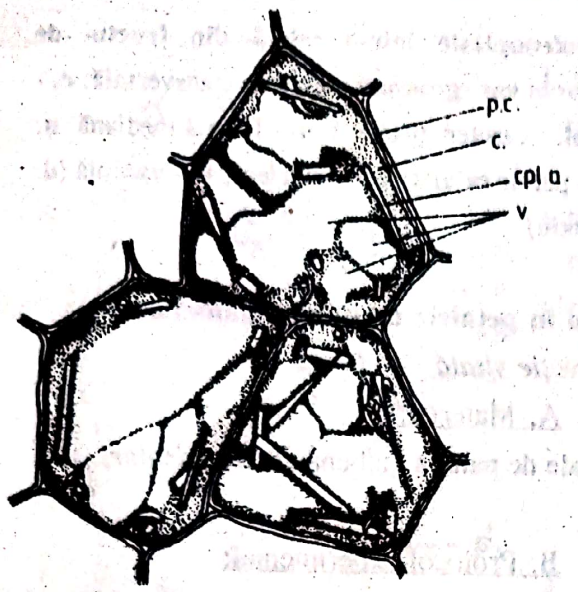


Fig. 40. Carotenoplaste în celule din rădăcina tuberizată de morcov (*Daucus carota*), secţiune transversală; c. - citoplasmă; cpl.a. - carotenoplaste aciculare; p.c. - perete celular; v. - vacuole (d. Filipescu şi Moţiu)

Studiu în fructul de gogoşar

Observaţie vitală

A. Material:

- Fruct (bacă) matur de gogoşar (***Capsicum annuum***, var. ***grossum***, fam. ***Solanaceae)***

B. Protocol experimental:

Secţiunile transversale subţiri, efectuate prin pericarp se montează într-o picătură de apă între lamă şi lamelă.

C. Observaţii:

În celulele poligonale ale pericarpului se observă carotenoplaste roşii, portocalii, sferice, lenticulare sau ovale. În aceste celule se mai pot observa una sau mai multe vacuole şi un nucleu de forma unui corpuscul sferic, mai refringent (Fig. 41).

D. Interpretare:

Carotenoplastele reprezintă acea categorie de plastide care conţin în stroma lor pigmenţi carotenoizi: *carotina* - de culoare roşie-portocalie, *licopina* - de culoare roşie şi *xantofila* - de culoare galbenă. Aceşti pigmenţi se pot prezenta în stare cristalizată sau amorfă.

Forma carotenoplastelor este, cel mai adesea, oval-sferică (când provin din cloroplaste sau leucoplaste), dar pot avea şi alte forme ca: aciculară, prismatică, triunghiulară, romboidală, în funcţie de forma cristalului.

Scanned with OKEN Scanner

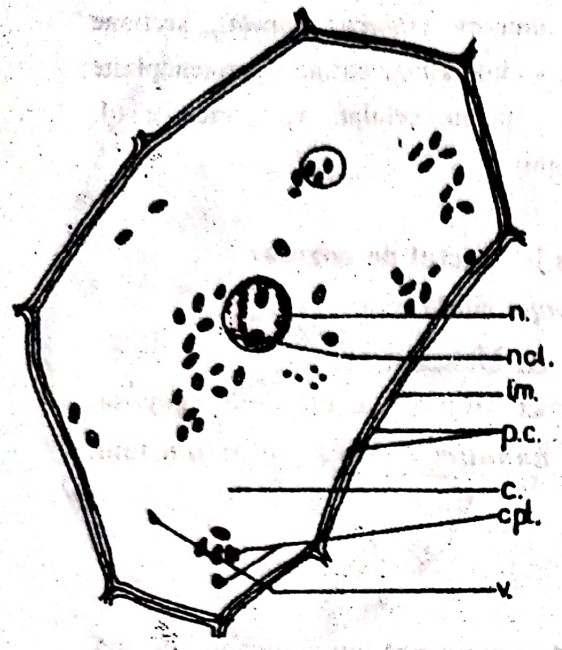


Fig. 41. Carotenoplaste într-o celulă din fructul de *Capsicum annuum* var. grossum, secţiune transversală: c. - citoplasmă; cpl. - carotenoplaste; l.m. - lamelă mediană; n. - nucleu; p.c. - perete celular; ncl. - nucleol; v. - vacuolă (d. Filipescu şi Moţiu)

Studiu în petalele de pansea galbenă

Observaţie vitală

A. Material:

- Petale de pansea galbenă (***Viola tricolor,*** fam. *Violaceae*)

B. Protocol experimental:

Se prelevează un fragment din epiderma inferioară (cea mai puţin colorată dintre cele două epiderme). Petala se aşează cu epiderma inferioară deasupra; cu penseta se crestează şi se detaşează un fragment, care se montează direct în apă, între lamă şi lamelă.

C. Observaţii:

Se cercetează celule întregi, situate pe marginea fragmentului. Observaţia este destul de dificilă, deoarece papilele ce formează protuberanţe deasupra volumului celular sunt presate între lamă şi lamelă şi apar sub forma unui cerc deasupra fiecărei celule. Pe de altă parte, o cuticulă plisată acoperă epiderma. Fiecare celulă este încojurată de un perete aşa-zis "ornamentat". Acest aspect se datoreşte faptului că celuloza emite spre interiorul celulei îngroşări mai mult sau mai puţin regulate, numite creste. În hialoplasma fin granuloasă şi în jurul nucleului se observă mici corpuri rotunjite, de culoare galbenă: acestea sunt carotenoplastele. Fiecare dintre ele este constituită astfel: în stromă apar clar granule colorate în galben, care sunt plastoglobulele. Aceste incluziuni conţin pigmenţi aflaţi în stare dizolvată în lipide (Fig. 42).

D. Interpretare:

Plastoglobulele conţin flavone asociate *xantofilei*, care constituie pigmentul dominant, derivat al carotenului. Carotenoplastele sunt foarte abundente în hialoplasmă şi sunt responsabile de culoarea petalei.

Scanned with OKEN Scanner

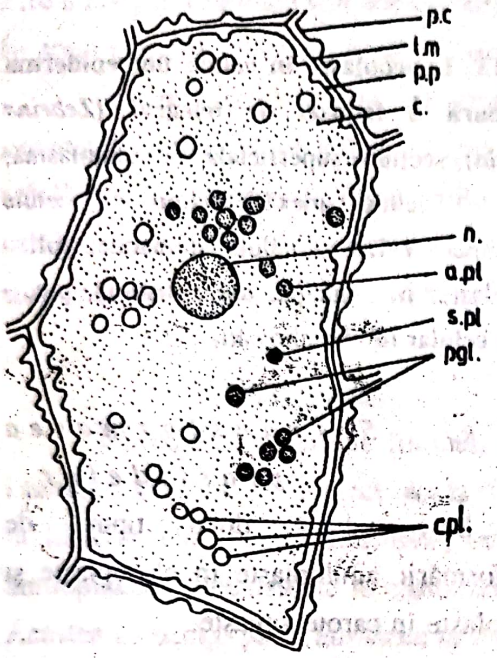


Fig. 42. Carotenoplaste într-o celulă din petala florii de trei fraţi pătaţi (*Viola tricolor*), secţiune superficială; a.pl. - anvelopă plastidială; c. - citoplasmă; cpl. - carotenoplaste; l.m. - lamelă mediană; n. - nucleu; pgl. - plastoglobuli; p.c. - perete celular; p.p. - pereţi primari; s.pl. - substanţă plastidială (d. Savouré şi Verger-Lagadec)

4. Leucoplastele

Observaţie vitală

A. Material:

- Frunze de telegraf (***Zebrina pendula***, fam. ***Commelinaceae***)

B. Protocol experimental:

Se prelevează un fragment din epiderma inferioară a frunzei şi se montează direct în apă, între lamă şi lamelă.

C. Observaţii:

Printre celulele epidermice mari, de formă poligonală se disting şi stomatele. Fiecare stomată este alcătuită din două celule reniforme - celulele stomatice - dispuse faţă în faţă cu concavităţile lor, delimitând între ele o deschidere numită ostiolă. În interiorul celulelor stomatice apare nucleul de formă sferică, dispus central şi numeroase cloroplaste. În jurul fiecărei stomate se găsesc patru celule anexe, dintre care cea superioară şi cea inferioară sunt mai mari, iar cele laterale mai mici. În toate aceste celule ale aparatului stomatic se observă numeroşi corpusculi sferici, incolori, foarte strălucitori sau mai refringenţi decât citoplasma, dispuşi în jurul nucleului. Aceste sferule sunt plastide incolore, numite leucoplaste, cu rol în acumularea şi condensarea unor substanţe organice, nutritive (glucide, lipide, proteine) (Fig. 43).

D. Interpretare:

Leucoplastele sunt plastide incolore, a căror stromă nu conţine pigmenţi. Sunt prezente în celulele ţesuturilor meristematice, în cele ale parenchimurilor de depozitare din constituţia organelor vegetative tuberizate (bulbi, rizomi, tuberculi) şi în celulele epidermice ale frunzelor multor monocotiledonate.

Scanned with OKEN Scanner

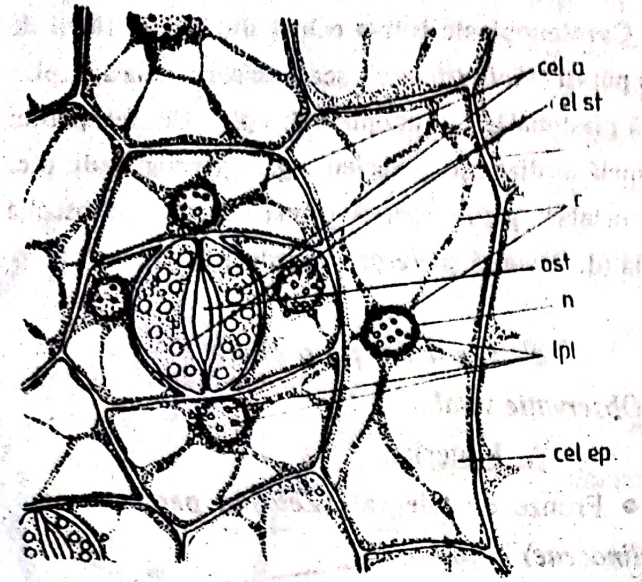


Fig. 43. Leucoplaste în celule din epiderma inferioară a frunzei de telegraf (*Zebrina pendula*), secţiune superficială: **c.** - citoplasmă; **cel.a.** - celule anexe; **cel.ep.** - celule epidermice; **cel.st.** - celule stomatice; **lpl.** - leucoplaste; **n.** - nucleu; **ost.** - ostiolă; **p.c.** - perete celular (d. Trankovski)

5°. Transformarea plastidelor

Se studiază două tipuri de transformări: amiloplaste în cloroplaste şi cloroplaste în carotenoplaste.

Transformarea amiloplastului în cloroplast

Observaţie vitală

A. Material:

- Tubercul de cartof (***Solanum tuberosum***, fam. *Solanaceae*)

B. Reactiv:

Soluţie de zaharoză 5%

C. Protocol experimental:

Se alege o zonă verde a parenchimului după ce s-a îndepărtat foarte uşor, cu acul spatulat, periderma care o acoperă. Secţiunile tangenţiale, realizate la suprafaţa părţii verzi, cea mai aproape de peridermă, sunt montate în reactiv între lamă şi lamelă.

D. Observaţii:

În interiorul celulelor, în hialoplasmă, se pot observa diferite tipuri de plastide: *amiloplaste* cu câte o granulă mare de amidon, *cloroplaste* verzui, relativ mici, grupate în grămezi în jurul nucleului rotunjit; în sfârşit, *plastide de tranziţie* (plastide mixte). Acestea din urmă sunt interesante căci ele sunt totodată amilacee şi clorofiliene: la interiorul unei anvelope plastidiale foarte subţiri, se distinge o granulă mare de amidon structurată; este amidonul elaborat iniţial de amiloplast. Acesta a suferit o transformare la nivelul substanţei sale plastidiale

Scanned with OKEN Scanner

care a luat, în totalitate sau adesea parţial, o culoare verde-galbenă şi care a devenit clorofiliană. În acest caz observăm un **amilo-cloroplast.**

Aceste plastide mixte pot conţine o granulă de amidon de volum variabil şi pot avea o substanţă plastidială de culoare verde mai mult sau mai puţin pronunţată. Pe de altă parte, în celulă pot fi eliberate de către amiloplaste granule de amidon. Remarcăm că, uneori, vacuola celulelor este vizibilă datorită prezenţei pigmenţilor antocianici; atunci trabeculele citoplasmice sunt nete; celulele conţin şi cristale de oxalat de calciu (Fig. 44).

E. Interpretare:

Înaintea expunerii la lumină, pulpa tuberculului conţinea în celulele sale amiloplaste. Lumina a avut un dublu efect: acela de a dezvolta, plecând de la proplastide ce există "de novo" în hialoplasmă, mici cloroplaste, cu sau fără amidon fotosintetic şi acela de a transforma amiloplastele preexistente în cloroplaste. Se obţin, în acest din urmă caz, plastide de tranziţie. Acestea au deci,o parte amilacee ce corespunde amidonului elaborat la obscuritate în amiloplast şi o parte clorofiliană ce corespunde biosintezei clorofilelor sub acţiunea luminii, la nivelul substanţei plastidiale a aceluiaşi amiloplast. Această transformare poate avea loc în acelaşi timp cu hidroliza amidonului.

Transformarea cloroplastului în carotenoplast

Observaţie vitală

A. Material:

- Fructe (bace) de tomate verzi ce încep a se matura (***Lycopersicum esculentum,*** fam. *Solanaceae*).

B. Protocol experimental:

Se prelevează, cu ajutorul unui ac spatulat, câte puţin material din mezocarp, imediat sub epicarp succesiv: într-o zonă verde, apoi într-o zonă verde-gălbuie şi, în sfârşit, într-o zonă galben-oranj. Se etalează de fiecare dată acest material pe o lamă la uscat (dacă este necesar, se poate adăuga puţină apă) şi se acoperă cu o lamelă.

C. Observaţii:.

Celulele sunt contigue în pulpa verde, apoi ele tind să se separe unele de altele.

În celulele zonei verzi, se observă în hialoplasmă, mai ales în jurul nucleului, o

Scanned with OKEN Scanner

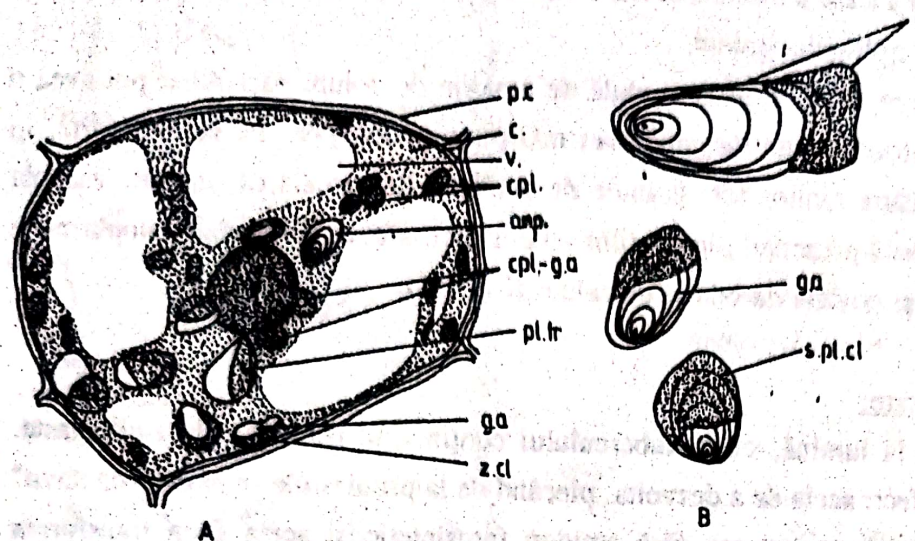


Fig. 44. Transformarea amiloplastelor în cloroplaste: celulă (A), plastide de tranziţie (B) din parenchimul tuberculului de cartof (*Solanum tuberosum*), observate de faţă: amp. - amiloplast; a.pl. - anvelopă plastidială; c. - citoplasmă; cpl. - cloroplaste; cpl.g.a. - cloroplaste cu granule de amidon; g.a. - granul de amidon; p.c. - perete celular; pl.tr. - plastide de tranziţie; s.pl.cl. - substanţă plastidială clorofiliană; v. - vacuolă (d. Savouré şi Verger-Lagadec);

aglomerare de plastide mici, de formă rotunjită şi de culoare verzuie: acestea sunt *cloroplastele*. În celulele zonei următoare, verde-gălbuie, în plastide similare cu stromă verzuie, apar una sau câteva pete de culoare oranj; ele indică prezenţa licopenului. În acest caz există un început de transformare a cloroplastului în carotenoplast. Celulele pulpei galben-oranj indică prezenţa *carotenoplastelor*.

D. Interpretare:

Cloroplastele sunt formate la lumină, plecând de la proplastide preexistente. În cursul maturării fructului are loc biosinteza carotenoizilor (licopen) pe seama pigmenţilor clorofilieni, ceea ce se realizează în fiecare din cloroplaste, care astfel se transformă treptat în carotenoplaste. Această transformare are loc în momentul când fructul, încă verde, virează la galbui, apoi la galben-oranj. Modificarea este ireversibilă, căci ea sfârşeşte prin degenerescenţa celulelor şi, deci, a plastidelor.

Plastidele, organite vii ale hialoplasmei, constituenţi caracteristici celulei vegetale au ca origine proplastide sau plastide nediferenţiate.

După tipurile celulare, acestea se diferenţiază în organite fotosintetice (cloroplaste) sau

Scanned with OKEN Scanner

în organite de rezervă (amiloplaste sau carotenoplaste). Cloroplastele fac biosinteza clorofilelor sub acţiunea luminii; carotenoplastele, pe cea a carotenoizilor; iar amiloplastele, pe cea a amidonului, plecând de la glucide solubile, mai ales la nivelul parenchimurilor de rezervă (de ex. în organe subterane).

În sfârşit, sub acţiunea factorilor externi ai mediului, plastidele pot să se transforme dintr-un tip într-un alt tip de plastidă; aceste modificări pot fi reversibile sau nu.

3. Nucleul

Se studiază nucleul interfazic şi nucleul în diviziune: ecvaţională (mitoza) şi reducţională (meioza).

1° Studiul nucleului interfazic (culescent):

1.1. La procariote

A. Material:

- Talul algei ***Oscillatoria sp.***, fam. ***Oscillariaceae***

B. Protocol experimental:

Se folosesc preparate permanente cu fragmente din talul filamentos al acestei alge.

C. Observaţii:

Oscillatoria este o algă albastră verde, cu tal filamentos pluricelular, neramificat. Capetele filamentului execută mişcări bruşte, oscilatorii. Filamentul este alcătuit din celule tabulare, mai late decât lungi.

Utilizând obiectivul cu imersie (100 x) se observă în celulele talului partea centrală sau *centroplasma*, care nu conţine pigmenţi şi este constituită dintr-o singură macromoleculă de ADN dublu catenar, dispersat în citoplasmă, formând *nucleoidul*. Acesta nu este separat de citoplasmă, ci se află în contact direct şi permanent cu citoplasma. Partea citoplasmatică periferică sau cromatoplasma conţine pigmenţi (clorofilă şi ficocianină, care îi dau culoarea verde-albastră), aceasta putând fi asemănată cu un cromatofor (Fig. 45).

Scanned with OKEN Scanner

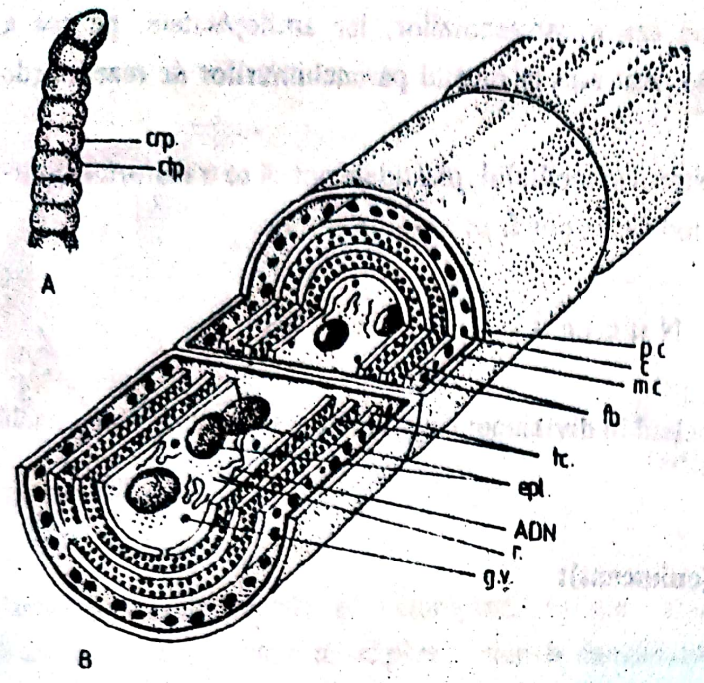


Fig. 45. Alga *Oscillatoria sp.*, observată la microscopul fotonic (fragment de tal - A) **şi la cel electronic** (schemă - B); **c.** - citoplasmă; **crp.** - cromatoplasmă; **ctp.** - centroplasmă; **epl.** - endoplaste; **fb.** - ficobilizomi; **g.v.** - granule de volutină; **m.c.** - membrană citoplasmatică; **p.c.** - perete celular; **r.** - ribozomi; **tc.** - lamele tilacoidale (d. Nultsch)

D. Interpretare:

Procariotele (bacteriile şi algele albastre - verzi), care se găsesc pe o treaptă inferioară de evoluţie a regnului vegetal, au un nucleu primitiv, netipic, denumit nucleoid (corp cromatic sau material nuclear) care nu este delimitat de o anvelopă proprie şi care este lipsit de nucleol.

Procariotele nu au aparat mitotic, de aceea ele se diviq amitotic, prin sciziparitate. Diviziunea celulei este precedată de diviziunea nucleoidului, care se face prin duplicarea longitudinală a moleculei de ADN.

1.2. La eucariote

În cursul evoluţiei celulei vii, nucleul a suferit continuu un proces de organizare şi perfecţionare, astfel că la organismele vegetale eucariote (celelalte grupe de plante inferioare şi superioare) materialul nuclear prezintă în mod constant unul sau mai mulţi nucleoli şi o anvelopă proprie.

Forma

A. Material:

- Tunici cărnoase din bulbul de ceapă (***Allium cepa***, fam. *Liliaceae*)
- ●● Frunze de telegraf (***Tradescantia virginica***, fam. *Commelinaceae*)
- ●●● Tunici cărnoase din bulbul de zambilă (***Hyacinthus sp.***, fam. *Liliaceae*)

Scanned with OKEN Scanner

B. Reactivi:

Verde de metil acetic, colorant selectiv pentru nucleu

Violet de genţiană, colorant selectiv pentru nucleu

C. Protocol experimental:

● Fragmente din epiderma superioară (internă) a unei tunici cărnoase din bulbul de ceapă, după colorare cu verde de metilacetic se montează în apă, între lamă şi lamelă.

●● În aceeaşi manieră se procedează şi cu fragmente din epiderma inferioară a frunzei de telegraf

●●● Fragmente din epiderma inferioară (externă) a unei tunici din bulbul de zambilă, după colorare cu violet de genţiană se montează în apă, între lamă şi lamelă.

D. Observaţii:

● În celulele tinere, bogate în citoplasmă, nucleii au formă sferică sau aproape sferică şi poziţie centrală. În celulele adulte, în care vacuola ocupă centrul celulei, nucleul de formă lenticulară, are poziţie laterală, fiind situat în stratul parietal de citoplasmă (Fig. 25 C).

●● În celulele stomatice, în stare de turgescenţă, din epiderma inferioară a frunzei de telegraf, se pot observa nuclei de formă semilunară (Fig. 46).

●●● Nucleul fusiform poate fi observat în celulele epidermei inferioare a unei tunici din bulbul de zambilă (Fig. 47)

E. Interpretare:

Forma nucleului este variată. Ea poate suferi modificări, în cursul vieţii celulei, din cauza incluziunilor paraplasmei sau din cauze patologice.

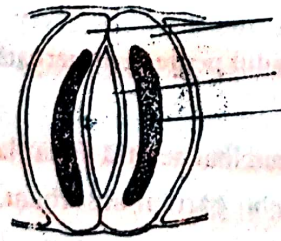


Fig. 46: Nuclei semilunari în celule stomatice din epiderma inferioară a frunzei de telegraf (*Tradescantia virginiana*), secţiune superficială; c.st. - celule stomatice; ost. - ostiolă; n.sl. - nucleu semilunar (orig.)

Scanned with OKEN Scanner

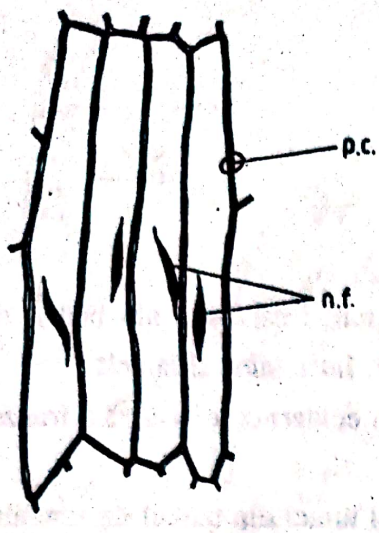


Fig. 47. Nuclei fusiformi în celule ale epidermei inferioare a unei tunici din bulbul de zambilă (*Hyacinthus sp.*), secţiune superficială; n.f. - nuclei fusiformi; p.c. - perete celular (orig.)

Poziţia

A. Materiał:

● Tunici cărnoase din bulbul de ceapă (*Allium cepa*, fam. *Liliaceae*)

●● Rădăcini de grâu (*Triticum aestivum*, fam. *Poaceae*)

●●● Frunze de *Aloë verrucosa*, fam. *Liliaceae*

B. Reactivi:

Verde de metil acetic, care colorează numai nucleii în verde-albăstrui, ceilalţi constituenţi rămânând incolori.

C. Protocol experimental:

● Se realizează preparate proaspete cu fragmente de epidermă, după tehnica deja cunoscută.

●● Cu o lamă de ras se decupează din vârful rădăcinii de grâu o porţiune de rizodermă cu peri absorbanţi şi se efectuează un preparat proaspăt.

●●● Se utilizează preparate permanente, cuprinzând secţiuni transversale prin frunza de Aloë.

D. Observaţii:

● În celulele tinere nucleul este situat **central**, iar în celulele adulte poate fi deplasat **lateral** de către o vacuolă centrală, mare, în stratul parietal de citoplasmă, aşa cum se poate observa în celulele epidermice ale tunicii bulbului de ceapă (Fig. 25 C).

●● În celulele care prezintă o creştere prin alungire, poziţia nucleului poate fi remarcată în apropierea zonei de creştere a peretelui celular.

În perişorii absorbanţi scurţi (foarte tineri) din rădăcina de grâu, nucleul se află situat la baza lor, iar în cei lungi (maturi), nucleul se observă în apropierea vârfului părului absorbant, poziţie ce indică rolul nucleului în creşterea apicală a acestuia (Fig. 48).

Scanned with OKEN Scanner

●●● Celulele epidermice ale frunzei de Aloë prezintă îngroşări centripetale ale peretelui extern, în secţiune transversală. În aceste celule nucleul este situat în apropierea îngroşării. Deplasarea nucleului în această poziţie demonstrează rolul nucleului în formarea peretelui primar şi secundar (Fig. 49).

E. Interpretare:

La eucariote, care prezintă un nucleu tipic, individualizat, forma, dimensiunile, poziţia şi numărul nucleilor variază la diferite tipuri de celule, în funcţie de stadiul de dezvoltare ontogenetică, starea fiziologică, gradul de evoluţie şi specializare a celulelor.

A se vedea **Capitolul II - ORGANIZAREA GENERALĂ A CELULEI VEGETALE:**

1. Observarea celulelor neclorofiliene: 3⁰ ***celula fixată şi colorată***: nucleul fixat şi colorat cu thionină fenică. În această observaţie, nucleul, delimitat de o anvelopă (membrană dublă), prezintă un aspect granulos; cromatina este colorată în violet; masa fundamentală sau nucleoplasma nu este colorată; nucleolii apar coloraţi în roz.

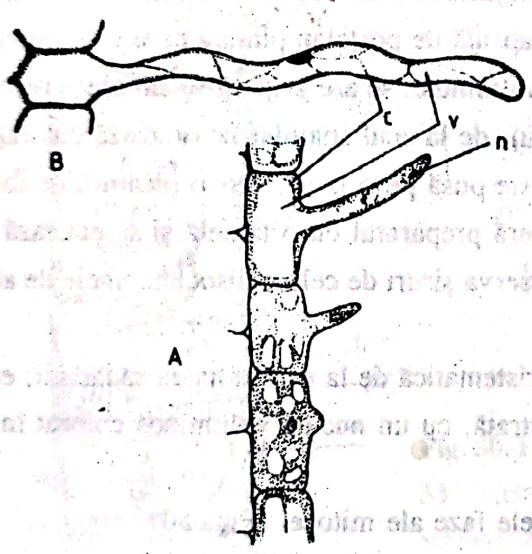


Fig. 48. Nuclei situaţi la baza (A) şi în apropierea vârfului (B) perilor absorbanţi ai rădăcinii de grâu (*Triticum aestivum*), secţiune transversală; c. - citoplasmă; n. - nucleu; v. - vacuole (d. Tutaiuk)

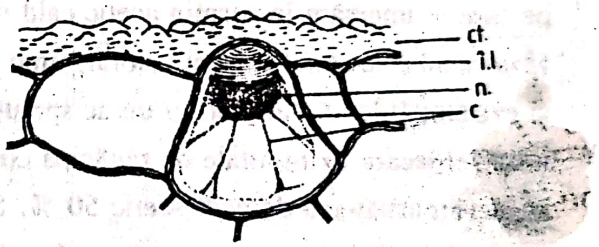


Fig. 49. Nucleu situat parietal într-o celulă din epiderma superioară a frunzei de *Aloë verrucosa*, secţiune transversală; c. - citoplasmă; ct. - cuticulă; î.l. - îngroşare laterală; n. - nucleu (orig.)

2⁰ Studiul nucleului în diviziune:

M i t o z a (diviziune ecvaţională, somatică, indirectă, tipică)

Ea cuprinde două procese: *cariocineza* - diviziunea nucleului existent în doi nuclei fii şi

Scanned with OKEN Scanner

citocineza - diviziunea citoplasmei, a tuturor organitelor citoplasmatice şi formarea peretelui despărţitor.

Este forma cea mai răspândită de înmulţire a celulelor somatice.

În urma diviziunii ecvaţionale rezultă 2 celule fiice diploide, fiecare având în nucleu un număr (2n) de cromosomi, egal cu cel avut de nucleul celulei mamă.

A. Material:

- Rădăcini (adventive) tinere formate de bulbul de ceapă (***Allium cepa,*** fam. *Liliaceae*)

B. Reactivi:

Carmin acetic

Acid acetic 50 %

C. Protocol experimental:

Se pun bulbi de ceapă, cărnoşi, pe recipiente de germinare pline cu apă, până la obţinerea de rădăcini adventive scurte. În momentul întrebuinţării se prelevează extremităţile rădăcinilor, pe care le imersăm în carmin acetic cald (într-o capsulă de porţelan plasată pe un bec Bunsen). Materialul este astfel fixat şi colorat, timp de câteva minute; se are grijă să se amestece reactivul şi extremităţile rădăcinilor cu un ac spatulat; fierul, de la acul spatulat favorizează coloraţia.

Fiecare extremitate de rădăcină colorată este pusă pe o lamă, într-o picătură de carmin acetic proaspăt sau de acid acetic 50 %. Se acoperă preparatul cu o lamelă şi se etalează uşor prin strivire, aşa încât la microscop să se poată observa şiruri de celule disociate unele de altele.

D. Observaţii:

La un măritor slab, se repereză zona meristematică de la extremitatea rădăcinii; ea are celule care apar de formă dreptunghiulară sau pătrată, cu un nucleu voluminos colorat în roz, în care cromosomii au o culoare roşie.

La un măritor puternic, se observă diferitele faze ale mitozei (Fig. 50).

1. **Profaza:**

Reţeaua de cromatină se organizează şi dă filamente lungi, fine şi încâlcite: cromosomii (al căror clivaj nu este încă vizibil). Nucleolii se dezorganizează. Anvelopa nucleară dispare. Nucleoplasma se amestecă cu citoplasma rezultând mixoplasma. Începe să se formeze fusul acromatic.

2. **Metafaza:**

Se încheie formarea fusului acromatic. Cromosomii sunt dispuşi în planul median al

Scanned with OKEN Scanner

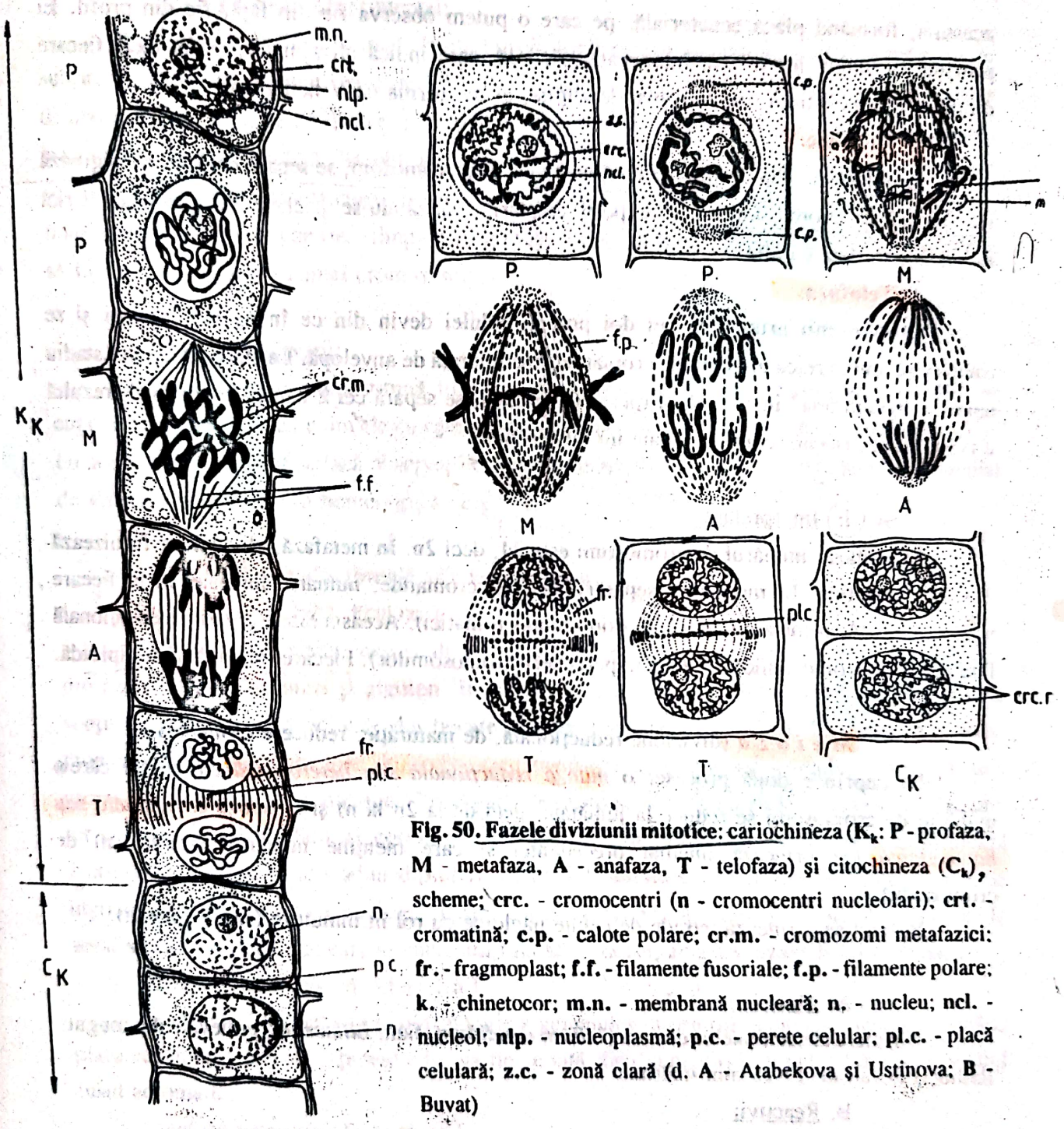


Fig. 50. Fazele diviziunii mitotice: cariochineza (K_k: **P** - profaza, **M** - metafaza, **A** - anafaza, **T** - telofaza) şi citochineza (C_k), scheme; **crc.** - cromocentri (**n** - cromocentri nucleolari); **crt.** - cromatină; **c.p.** - calote polare; **cr.m.** - cromozomi metafazici; **fr.** - fragmoplast; **f.f.** - filamente fusoriale; **f.p.** - filamente polare; **k.** - chinetocor; **m.n.** - membrană nucleară; **n.** - nucleu; **ncl.** - nucleol; **nlp.** - nucleoplasmă; **p.c.** - perete celular; **pl.c.** - placă celulară; **z.c.** - zonă clară (d. **A** - Atabekova şi Ustinova; **B** - Buvat)

Scanned with OKEN Scanner

acestuia, formând placa ecuatorială, pe care o putem observa fie din față, fie din profil. Ei prezintă în lungul lor o linie întunecată, vizibilă, care indică clivajul lor, astfel încât fiecare dintre ei este constituit din 2 cromatide alipite, având forma de V neregulat.

3. Anafaza:

Cromatidele alipite, din fiecare pereche a unui cromosom, se separă complet şi migrează sub formă de cromosomi fii spre polii celulari, realizându-se pachete de cromatide strict asemănătoare una cu alta.

4. Telofaza:

Cromosomii grupaţi la cei doi poli ai celulei devin din ce în ce mai sinuoşi şi se transformă într-o reţea grosieră de cromatină, înconjurată de anvelopă. La sfârşitul acestui stadiu apare o "membrană" intercelulară (peretele celular), se separă cei 2 nuclei-fii. În final, rezultă 2 celule-fiice, fiecare conţinând câte un nucleu nou.

E. Interpretare:

În profază, numărul de cromosomi este 24, deci 2n. În metafază, clivajul lor furnizează 2 x 2n cromatide. În momentul separării fiecărei cromatide, numărul lor este 2n în fiecare nucleu, deci 24 cromosomi-fii (cromosomi monocromatici). Aceasta este o diviziune ecvaţională fără reducere cromosomică (absenţa împerecherii cromosomilor). Fiecare celulă rămâne diploidă.

M e i o z a (diviziune reducţională, de maturaţie, reducere cromatică)

Ea cuprinde două procese: o *mitoză reducţională sau heterotipică* (în cursul căreia numărul de cromosomi se reduce la jumătate, deci de la 2n la n) şi o *mitoză ecvaţională sau homeotipică* (ce urmează imediat precedentei şi care menţine numărul haploid (n) de cromosomi).

În final se formează tetrade de celule haploide cu rol în înmulţire (spori, gameţi).

A. Material:

- Antere ale staminelor de crin (***Lilium candidum***, fam. ***Liliaceae***), prelevate din muguri (boboci) florali de 13-15 mm înălţime

B. Reactivi:

Alaun de fier

Hematoxilină

Scanned with OKEN Scanner

C. Protocol experimental:

După tehnica utilizată în mod obişnuit în citologie pentru incluziuni, se realizează secţiuni subţiri la microtomul Minot, pe material inclus în parafină. Secţiunile sunt imersate într-o baie de alaun de fier, timp de 24 de ore; apoi sunt spălate şi puse în hematoxilină, timp de 24 de ore, iar în final, în apă distilată. Se obţine astfel o coloraţie neagră a cromosomilor nucleului. Se verifică la microscop intensitatea acestei coloraţii: dacă şi restul celulei este colorat se face o nouă imersiune în alaun de fier, timp de 10 minute. Se spală şi se colorează din nou, astfel încât să fie coloraţi în negru numai cromosomii.

D. Observaţii:

Stamina florii este constituită în partea sa superioară din anteră (porţiune fertilă), ce cuprinde două loje, fiecare din ele cu câte doi saci polinici, unde se formează granulele de polen. La acest nivel trebuie să se facă observaţiile: mitoza reducţională sau heterotipică urmată imediat de mitoza ecvaţională sau homeotipică (Fig. 51).

Mitoza reducţională sau heterotipică

Profaza heterotipică: Profaza I

Ea cuprinde 5 stadii, mai mult sau mai puţin dificil de distins, mai ales la începutul profazei: stadiile **leptoten** şi **zigoten**, în timpul cărora cromosomii monocromatidici, foarte subţiri se împerechează doi câte doi fiecare pereche formând un bivalent. În stadiul **pachiten**, cromosomii fii sau perechile de cromosomi prezintă în lungul lor granulaţii: acestea sunt cromomerele. Apoi ei iau un aspect" ondulat", se răsucesc, devenind groşi. La mijlocul lungimii lor se remarcă o linie clară, ce corespunde clivării fiecărui cromosom împerecheat: se formează 2 cromatide, acesta fiind stadiul **diploten**. În stadiul **diacineză**, cromosomii se scurtează şi se îngroaşă, formând figuri simetrice: fiecare cuplu de cromosomi clivaţi se numeşte gemen. În acest stadiu anvelopa nucleară şi nucleolul tind să se dezorganizeze, apare fusul acromatic.

Metafaza heterotipică: Metafaza I

Se constată o orientare şi o dispoziţie a gemenilor la centrul fusului acromatic, formând placa ecuatorială pe care o putem observa fie de faţă, fie din profil; în ultimul caz devine vizibil fusul acromatic.

Anafaza heterotipică: Anafaza I

Cromatidele se separă la nivelul fiecărui cromosom. Când ei ajung la polii fusului

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 51 a

Scanned with OKEN Scanner

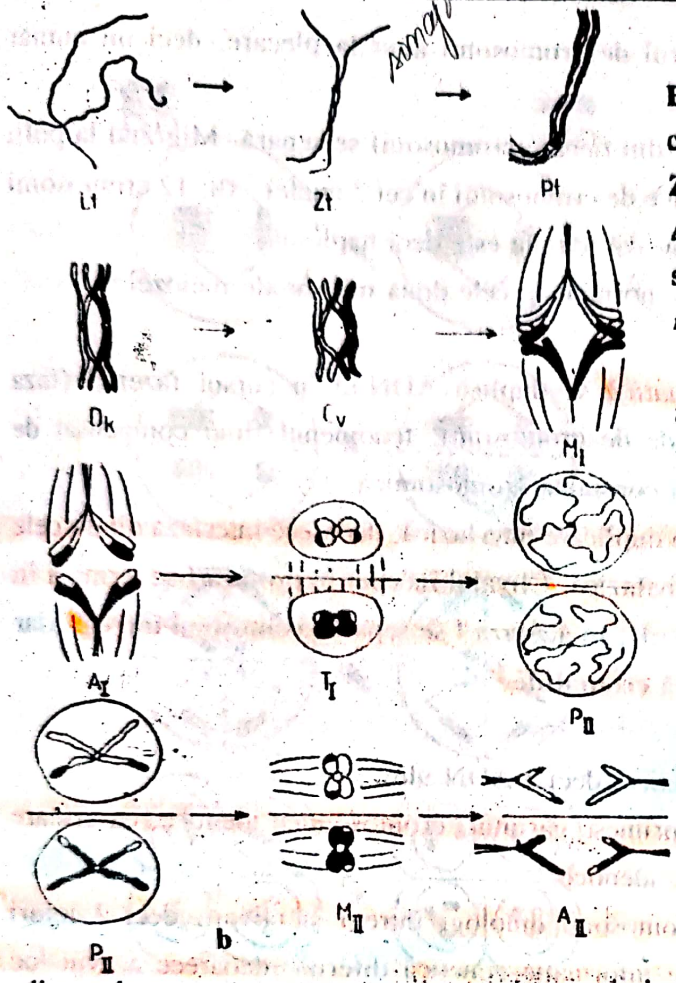


Fig. 51. Fazele diviziunii meiotice: cariochineza (K_d): P_I - profaza I (Lt - leptoten, Zt - zigoten, Pt - pachiten, Dk - diacineză), M_I, A_I, T_I, A_{II}) şi citochineza (Ck); detalii (a), scheme (b); bv - bivalenţi; ms. - microspori (d. A-Trankovski; B-Brown şi Bertke)

acromatic, este sfârşitul acestui stadiu şi începutul celui următor.

Telofaza heterotipică: Telofaza I

Se observă două grupe de cromosomi. Între ele apare o "membrană" intercelulară (perete celular) şi astfel rezultă două celule fiice cu nucleii haploizi.

Mitoza ecvaţională sau homeotipică

Metafaza homeotipă (metafaza II) se desfăşoară pentru fiecare nucleu fiu. Cromosomii clivaţi încă din profaza I se dispun la centrul fiecărui fus acromatic constituind placa ecuatorială.

În *anafaza homeotipică* (anafaza II), are loc migraţia cromatidelor la polii fusurilor acromatice. În *telofaza homeotipică* (telofaza II) se realizează 4 pachete egale de cromosomi. Se formează astfel 4 celule uninucleate care constituie o tetradă. Aceasta dă în final 4 granule de polen.

E. Interpretare

La început există 24 cromosomi (2n) în fiecare celulă; aceasta este deci diploidă. Începând din profaza I în stadiul zigoten, imperecherea cromosomilor conduce la formarea a 12 cupluri de cromosomi. Crossing overul cu schimburi de segmente cromosomice are loc în stadiul diploten, când se produce clivarea cromosomilor în cromatide. Reducerea cromosomică se termină, la sfârşitul stadiului diacinezei, cu formarea a 12 gemeni, adică 12 mase cromatice.

ceea ce echivalează cu jumătate din numărul de cromosomi avut la plecare, deci un număr haploid; aceasta este diviziunea reducțională.

În cursul mitozei, fiecare cromatidă (din fiecare cromosom) se separă. Migrând la polii fusului acromatic se realizează 2 loturi identice de cromosomi în cei 2 nuclei - fii: 12 cromosomi sau setul haploid (n). Fiecare celulă ce formează tetrada este deci haploidă.

Diferențe între două mitoze somatice normale și cele două mitoze ale meiozei:

1. ◆ În fiecare *mitoză somatică* se duplică ADN-ul în cursul fazei S (faza sintetică a interfazei) (rezultând 2 cromatide de cromosom), fenomenul fiind compensat de disocierea lor anafazică, încât este garantată constanta cromosomică.

◆ În *meioză* are loc o singură duplicare interfazică, deoarece interfaza dintre cele 2 mitoze ale ei lipsește. Au loc 2 disocieri anafazice. Clivajul început în profaza I se termină în anafaza I, dar devine eficient doar în anafaza II. În anafaza I se separă cromosomi întregi (dar clivați), în timp ce în anafaza II se disociază cromatide.

2. Repartiția informației genetice, deci a ADN-ului:

◆ În *mitoza somatică* cei 2 nuclei primesc garnituri cromosomice identice, ca urmare a disocierii anafazice a cromatidelor genetic identice;

◆ În *meioză*, anafaza I separă cromosomi omologi întregi și clivați, deci 2 loturi cromosomice echivalente ca număr, dar de informație genetică diferită, deoarece a avut loc crossing-overul și cromosomii sunt de origine sexuală diferită.

3. ◆ În metafaza fiecărei *mitoze somatice*, centromerii cromosomilor clivați sunt situați la ecuatorul fusului acromatic și legați la cei 2 poli;

◆ În *metafaza meiozei*, centromerii cromosomilor clivați sunt situați de o parte și de alta a planului ecuatorial și fiecare din ei este legat doar la un singur pol al fusului acromatic.

4. ◆ La sfârșitul a 2 *mitoze somatice* succesive, pereții celulari pot avea orientări diferite, ce depind de orientarea fuselor acromatice.

◆ La sfârșitul *meiozei* (cu cele 2 diviziuni) rezultă o tetradă în cruce (microsporogeneza) sau liniară (macrosporogeneza) (Fig. 52).

Scanned with OKEN Scanner

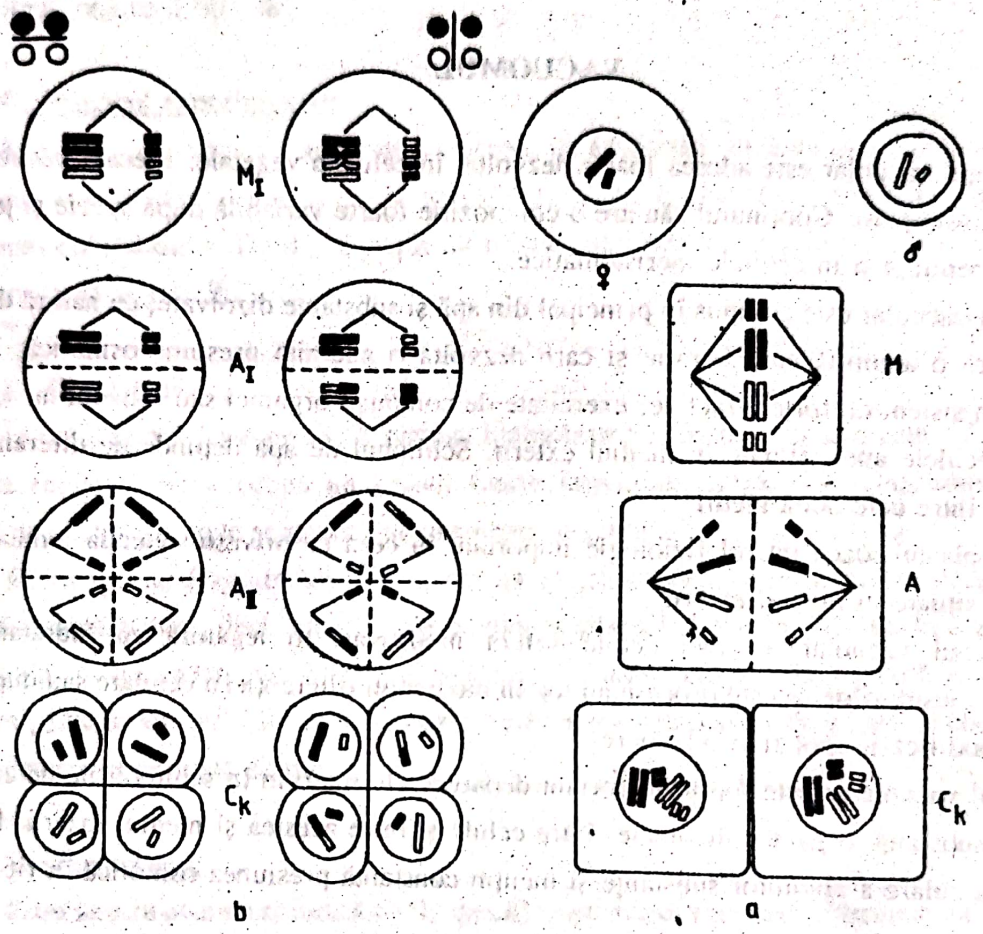


Fig. 52. Comparaţie între principalele faze ale diviziunii mitotice (a: M - metafaza, A - anafaza, Ck - citochineza) şi a celei meiotice (b: M_I - metafaza I, A_I - anafaza I, A_{II} - anafaza II, Ck - citochineza), scheme (d. Strasburger)

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL IV

VACUOMUL

Sistemul vacuolar este adesea foarte dezvoltat în celulele vegetale. Fiecare vacuolă este delimitată de tonoplast. Conţinutul său are o compoziţie foarte variabilă după specie şi ţesut; el este dens în seminţe şi în celulele meristematice.

Sucul vacuolar este compus în principal din apă şi substanţe dizolvate, de natură diversă, care-i conferă o anumită concentraţie şi care dezvoltă o anumită presiune osmotică; aceasta reprezintă un sistem de forţe atractive, exercitate de compuşii organici sau minerali ai vacuolei faţă de moleculele apei, situate în mediul extern. Schimbul de apă depinde de diferenţele de concentraţie între cele două medii.

Tonoplastul joacă un rol fiziologic important în ceea ce priveşte selecţia ionilor sau a moleculelor situate în mediul extern.

Sistemul vacuolar al unei celule suferă modificări în legătură cu hidratarea sau deshidratarea ţesuturilor; aceste procese au loc în momentul diferenţierii celulare sau după acest fenomen; modificările pot fi şi sezoniere.

Rolul vacuolelor este foarte important deoarece ele intervin în schimburile de apă, ioni minerali şi substanţe organice dizolvate, între celule şi între acestea şi mediul extern. Ele sunt locul de acumulare a anumitor substanţe şi menţin constantă presiunea osmotică în fiecare din celule.

După examenul vacuolei dintr-o celulă adultă, colorată vital, se vor lua în atenţie câteva exemple de conţinut vacuolar. Pentru a ţine seama de evoluţia acestor vacuole în raport cu vârsta celulelor, se va realiza acest studiu într-un organ în curs de creştere (de exemplu: rădăcina plantulelor tinere de grâu). În seminţele ajunse la maturitate deplină, vacuolele sunt deshidratate şi reprezentate de corpuri figurate (de exemplu: celulele albumenului seminţei de ricin).

1. Coloraţia vitală a vacuolei

A. Material:

• Epiderma superioară (internă) a unei tunici mijlocii din bulbul de ceapă (*Allium cepa*, fam. *Liliaceae*)

Scanned with OKEN Scanner

B. Reactiv:

Roşu neutru 0,001 %

C. Protocol experimental:

Se prelevează câteva fragmente proaspete de epidermă, care se pun într-o sticlă de ceas ce conţine soluţie de roşu neutru. Se acoperă totul cu o altă sticlă de ceas pentru a limita evaporarea colorantului. După cel puţin 30 minute de imersie, se pune unul din fragmente în apă, între lamă şi lamelă.

D. Observaţii

În celulele vii (este prezentă cicloza hialoplasmei), numai vacuola este colorată în roz-roşu; se remarcă că ea ocupă un volum foarte important, împingând citoplasma şi nucleul necolorate, lângă peretele scheletic, de asemenea necolorat.

Pe marginile fragmentului de epidermă există celule lezate mecanic. Acestea nu mai prezintă cicloză şi sunt, deci, moarte. Ele conţin citoplasmă şi nucleu colorate în roz-roşu şi sunt înconjurate de un perete de asemenea colorat. Volumul ocupat de vacuolă este optic vid, necolorat, fără tonoplast. Totodată, se poate observa şi o citoplasmă coagulată şi colorată în roz, adesea dispersată în toată celula.

E. Interpretare:

Roşu neutru este un colorant vital, specific sistemului vacuolar. Pătrunderea sa în vacuolă se realizează prin fenomenul de absorbţie. El se acumulează fără a mări concentraţia sucului vacuolar. Această coloraţie este, pe de altă parte, mai importantă cu cât vacuola conţine mai mulţi coloizi electro-negativi.

2. Studiul câtorva conţinuturi vacuolare

Produşii acumulaţi în vacuolă sunt diverşi. Este posibil de a pune în evidenţă pe cei care colorează sucul vacuolar şi pe cei care cristalizează în mod natural. Trebuie, de asemenea, precizat că anumiţi compuşi nu pot fi puşi în evidenţă decât cu ajutorul reactivilor specifici.

1° Substanţe vacuolare dizolvate şi colorate: antocianii petalelor de flori şi ai pulpei fructelor

Scanned with OKEN Scanner

A. Material:

● Petale de flori de muşcată (***Pelargonium sp.***, fam. *Geraniaceae*; roşii),anemonă (***Amenone sp.***, fam. *Ranunculaceae*; roşii, violete, albastre), crizantemă (***Chrysanthemum sp.*** - fam. *Asteraceae*; roşii, mov), trandafir (***Rosa sp.*** - fam. *Rosaceae;* roşii), pansea (***Viola sp.*** - fam. *Violaceae*; mov) ş.a.

●● Fruct (bacă) matur de lemn câinesc (***Ligustrum vulgare*** - fam. *Oleaceae*)

B. Reactivi:

Amoniac de 20 %.

Acid acetic 20 %

C. Protocol experimental:

● Se prelevează un fragment din epiderma inferioară a petalei crestând-o, plecând de la tăietura realizată oblic în raport cu suprafaţa, cu ajutorul unei lame de ras. Se pune într-o picătură de apă între lamă şi lamelă. Se observă coloraţia naturală a vacuolei. Se face să treacă succesiv sub lamelă, soluţia bazică, apoi soluţia acidă. Se notează de fiecare dată modificările de coloraţie.

●● Se prelevează cu ajutorul unui ac spatulat, material din mezocarp, imediat sub epicarp. Se pune în apa şi se etalează materialul între lamă şi lamelă, astfel încât să poată fi observate celule izolate.

D. Observaţii:

● Celulele epidermice au o vacuolă voluminoasă colorată în roşu-oranj, mărginită de o citoplasmă granuloasă, ea însăşi delimitată la exterior de un perete ornamentat de creste celulozice scurte. În momentul adăugării amoniacului, culoarea sucului vacuolar virează spre albăstru-violaceu. Trecerea soluţiei acide provoacă un viraj spre roşu strălucitor a culorii sucului vacuolar (Fig. 53 A).

●● Vacuola, colorată în violet (culoarea indică un pH neutru), este înconjurată de o citoplasmă granuloasă, ce conţine câteva cloroplaste; acestea se dispun ca o coroană în jurul nucleului, care în acest mod este perfect reperabil (fig. 53 B).

Scanned with OKEN Scanner

E. Interpretare

Vacuola este colorată în mod natural datorită pigmenţilor antocianici, care se află în stare dizolvată. Trecerea unei soluţii alcaline sau acide în mediul de montaj iniţial, determină pătrunderea în vacuolă fie a ionilor OH^-, fie a ionilor H^+. În aceste cazuri se observă un viraj al coloraţiei antocianilor. Ei sunt heterozide fenolice ale căror agliconi sunt antocianidine, purtători ai coloraţiei. Aceştia sunt corpuri amfotere care, cu acizii dau săruri de culoare roşie şi cu bazele, săruri de culoare albastră.

Montajul tuturor acestor materiale în apă permite a observa culoarea naturală a antocianilor vacuolari. Soluţiile acide le dau în general o culoare roşie mai mult sau mai puţin intensă; dimpotrivă, soluţiile bazice îi fac să vireze spre albastru sau albastru-violet. Este necesar de precizat că se poate obţine uneori cu baze, coloraţia verde; aceasta este o coloraţie aberantă, căci ea este semnul unei denaturări a proteinelor celulare.

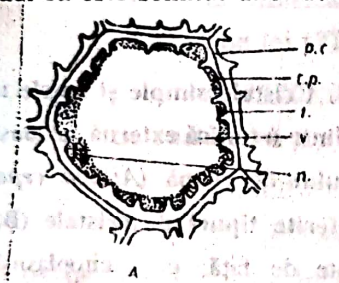
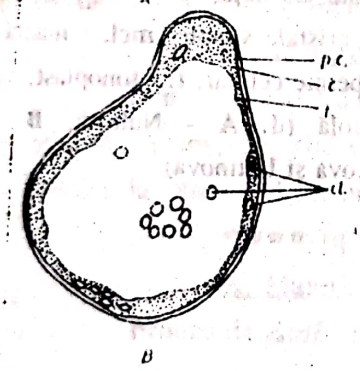


Fig. 53. Vacuole colorate natural cu antociani într-o celulă din: petala de muşcată (*Pelargonium sp.*) (A), fructul de lemn câinesc (*Ligustrum vulgare*) (B), observate de faţă; **cl.** - cloroplaste; **c.p.** - citoplasmă parietală; **n.** - nucleu; **p.c.** - perete celular; **t.** - tonoplast; **v.** - vacuolă (d. Savouré şi Verger-Lagadec)



2⁰ Conţinut vacuolar cristalizat în mod natural: oxalatul de calciu

● În tunicile externe, pergamentoase ale bulbului de ceapă

A. Material:

Tunici externe, uscate, solzoase (scvame, catafile) ale bulbului de ceapă (***Allium cepa***, fam. ***Liliaceae***) sau de usturoi (***Allium sativum***, fam. ***Liliaceae***)

B. Reactiv:

Soluţie concentrată de amoniac

C. Protocol experimental:

Se prelevează tunici externe uscate, brunificate ale bulbului de ceapă sau de usturoi. Se imersează timp de cel puţin o oră în reactiv pentru a facilita impregnarea cu apă a materialului. Se spală apoi tunicile în apă abundentă. Se rupe una dintre ele, astfel încât să se obţină pe

Scanned with OKEN Scanner

marginea fragmentului, o singură pătură de celule, care se montează în glicerină, între lamă şi lamelă.

D. Observaţii:

Epiderma acestei tunici este formată din celule înconjurate de un perete pecto-celulozic prezentând punctuaţii de grosime inegală. Ele nu conţin decât cristale de oxalat de calciu, având formă de prisme, simple sau grupate (întretăiate) pentru a constitui macle, uneori cu vârfuri de octoedri (Fig. 54).

E. Interpretare:

Celulele tunicilor uscate sunt celule moarte; cristalele constituie în acest caz un deşeu celular; sistemul de cristalizare al oxalatului de calciu (sare trihidratată) dă cristale prismatice simple sau asociate, în care caz se regăsesc macle.

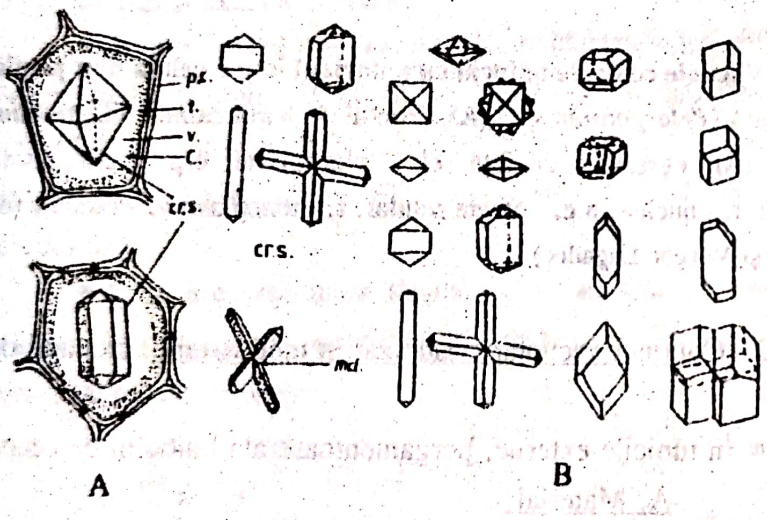


Fig. 54. Cristale simple şi macle în celule dintr-o tunică externă solzoasă a bulbului de ceapă (*Allium cepa*) (A); diferite tipuri de cristale (B), observate de faţă; c. - citoplasmă; cr.s. - cristale simple; mcl. - maclă, p.c. - perete celular; t. - tonoplast; v. - vacuolă (d. A - Nultsch, B - Atabekova şi Ustinova)

●● În peţiolul frunzei de iederă

A. Material:

Peţiolul frunzei de iederă (***Hedera helix*** fam. *Araliaceae*)

B. Protocol experimental:

Cu ajutorul unui brici se execută secţiuni transversale prin peţiolul frunzei de iederă. Se montează în apă, între lamă şi lamelă.

C. Observaţii:

Se reperează pe secţiune, parenchimul cortical clorofilian şi cel fundamental. Celulele celui dintâi au câte o vacuolă mare, înconjurată de o citoplasmă granuloasă, ce conţine

Scanned with OKEN Scanner

cloroplaste. În unele din ele, volumul este ocupat de un corp de culoare cenuşie, relativ voluminos, prevăzut la exterior cu vârfuri. Acest element este un cristal de oxalat de calciu compus, sub formă de **macle** sau **ursini**. Astfel de elemente pot fi observate şi în celulele parenchimului fundamental (Fig. 55 A).

D. Interpretare:

Acidul oxalic, rezultând din metabolismul respiraţiei, este toxic pentru celulă. El devine insolubil prin cristalizare sub formă de oxalat de calciu, care se acumulează în vacuolele celulelor. De aceea se observă cristale de formă diferită, după gradul de hidratare a sării. În cazul de care ne ocupăm, aceasta este o sare trihidratată ($C_2O_4Ca \times 3H_2O$) care se constituie sub formă de octoedri, asociaţi în macle sau în ursini.

●●● În tulpina de tei

A. Material:

Ramură de tei (***Tilia sp.*** fam. *Tiliaceae*)

B. Protocol experimental

Se analizează preparate permanente cu secţiuni transversale printr-o ramură de tei.

C. Observaţii:

În celulele parenchimului cortical şi medular din tulpina de tei se observă cristale de oxalat de calciu, sub formă de **ursini** sau **druze** (Fig. 55 B).

D. Interpretare:

Ursinii reprezintă cea mai răspândită formă de cristale de oxalat de calciu; au un aspect globulos ţepos, datorită concreşterii unui număr mare de cristale ale căror vârfuri ascuţite se disting la exteriorul formaţiunii.

●●●● În frunzele de Aloë sp.

A. Material:

Frunze de ***Aloë arborescens,*** fam. *Liliaceae*

B. Protocol experimental:

Se analizează preparate permanente cu secţiuni longitudinale prin frunza de Aloë sp.

C. Observaţii:

În ţesutul asimilator al frunzei, din loc în loc, pot fi observate celule poligonal-ovale sau fusiforme, mult mai mari faţă de celulele obişnuite ale mezofilului. În aceste celule se observă fascicule de cristale aciculare, cu capetele ascuţite, numite **rafide.**

Scanned with OKEN Scanner

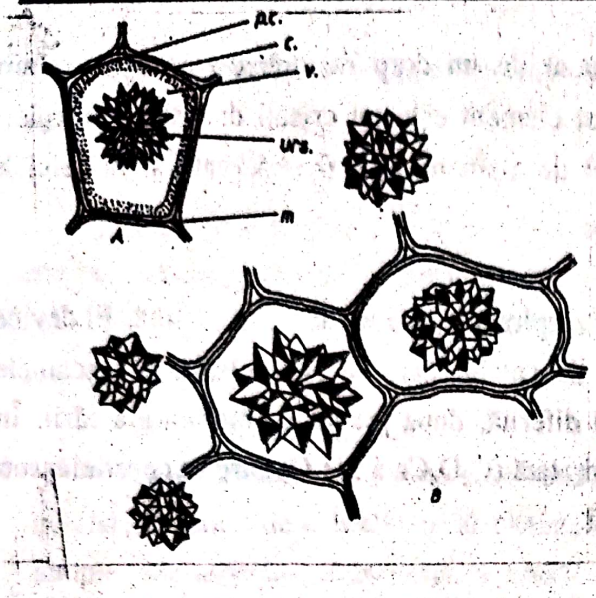


Fig. 55. Ursini în celule parenchimatice din peţiolul frunzei de iederă (*Hedera helix*) (A), tulpina de tei (*Tilia sp.*) (B), secţiuni transversale; c. - citoplasmă; p.c. - perete celular; m. - meat; urs. - ursin; v. - vacuolă; (d. A - Nultsch, B - orig.)

D. Interpretare:

Rafidele sunt dispuse adesea într-o vacuolă mare, fiind învelite într-o substanţă mucilaginoasă. În cazul când secţiunea a trecut prin mijlocul celulei, cristalele apar uşor dispersate sau celula este goală (Fig. 56).

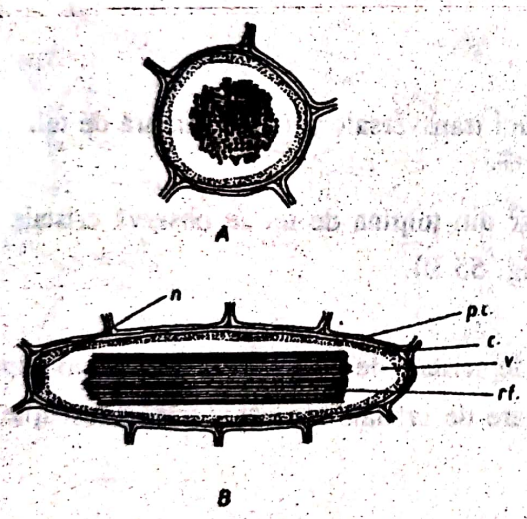


Fig. 56. Rafide în celule din mezofilul frunzei de *Aloë arborescens*, secţiuni: transversală (A), longitudinală (B); c. - citoplasmă; p.c. - perete celular; n. - nucleu; rf. - rafide; v. - vacuolă (d. Nultsch)

3⁰ Conţinut vacuolar cristalizabil prin deshidratare artificială: inulina

A. Material:

- Tubercul radicular de dalie (*Dahlia variabilis*, fam. *Asteraceae*), conservat în alcool de 70⁰. Tuberculii sunt tăiaţi în cuburi cu latura de aproximativ 3 cm. Sunt imersaţi succesiv în: alcool 50%, timp de 48 de ore, alcool 70%, timp de 48 de ore, alcool de 90% timp de 1 săptămână, alcool din comerţ, timp de 48 ore.

B. Reactiv:

Glicerină anhidră

C. Protocol experimetal:

Se execută secţiuni tangenţiale fine prin fragmentul de tubercul.

Scanned with OKEN Scanner

D. Observaţii:

În celulele parenchimului de rezervă, care au fost golite de conţinutul lor, ca urmare a deshidratării materialului în alcool, se observă depuneri de inulină. Ele se prezintă sub formă de evantaie cenuşii de mărime variabilă, aplicate pe peretele pecto-celulozic al celulei, la colţuri sau la nivelul unei punctuaţii. Acestea sunt structurate astfel: este vizibilă o striaţie radiară, ceea ce le conferă o margine dantelată; pe de altă parte, depunerile pot să se suprapună (Fig. 57).

E. Interpretare:

Inulina constituie o rezervă glucidică (este un ozid) pentru speciile de plante din familia *Asteraceae*. Când celula este vie, acest glucid se află sub formă de soluţie coloidală în vacuolă. Prin deshidratare artificială cu alcool, cristalizarea are loc la contactul cu peretele celular. Se formează atunci numeroase cristale aciculare, care agregându-se formează sferocristale în formă de evantaie, de unde aspectul dantelat al marginilor şi structura radiară a ansamblului. Cristalizarea se produce după diferite planuri.

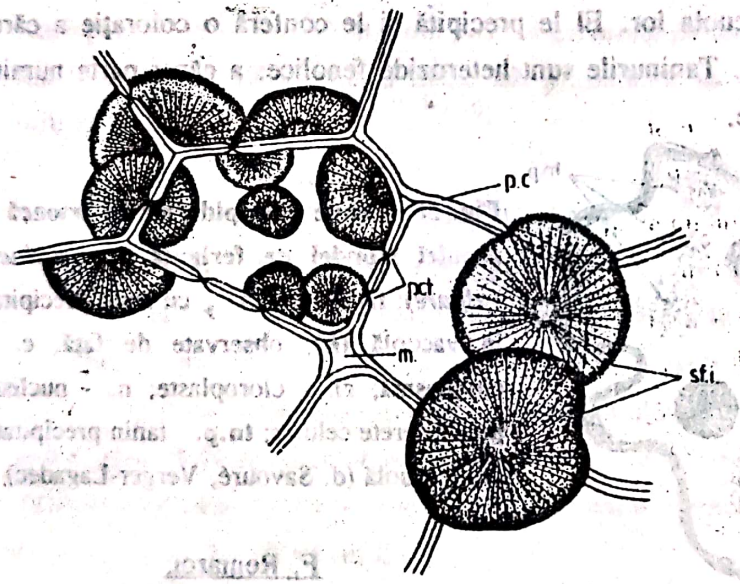


Fig. 57. Sferocristale de inulină în celule din rădăcina tuberizată de dahlie (*Dahlia variabilis*), secţiune tranversală; m. - meat; pct. - punctuaţii; p.c. - perete celular; sf.i. - sferocristale de inulină; (d. Trankovski)

4°. Conţinut vacuolar caracterizat prin acţiunea reactivilor specifici: taninurile

A. Material:

- Frunză (frondă) de feriguţă dulce (*Polypodium vulgare*, fam. *Polypodiaceae*)

B. Reactiv:

Soluţie apoasă de bicromat de potasiu ($K_2O_7Cr_2$) 5 %.

C. Protocol experimental:

Se desprinde cu briciul, epiderma inferioară a unui segment (pinulă) al frondei; acesta,

recunoscut după nervura sa proeminentă, este pus pe deget şi, cu lama de ras, se răzuieşte o parte din epidermă. Se imersează în reactiv timp de 5-10 minute. Se spală cu apă şi se montează într-o picătură de apă, între lamă şi lamelă.

D. Observaţii:

Se observă două tipuri de celule: unele verzi, de forma a 2 boabe de fasole, alipite şi constituind o stomată; celelalte, de formă ondulată, imbricate unele în altele; acestea sunt celulele epidermice. În acestea din urmă, citoplasma şi nucleul sunt galbene; câteva cloroplaste gălbui sunt situate lângă perete sau sunt vizibile de faţă, prin transparenţă, în lungul vacuolei, care este, de asemenea, colorată; intensitatea coloraţiei, de la galben la brun, este variabilă de la o celulă la alta. Culoarea se datoreşte prezenţei unui precipitat intravacuolar de tanin, ale cărui particule sunt vizibile. Anumite celule au o vacuolă optic vidă (Fig. 58).

E. Interpretare:

Bicromatul de potasiu pătrunde în toate celulele epidermice, unele din ele conţinând taninuri în soluţie coloidală în vacuola lor. El le precipită şi le conferă o coloraţie a cărei intensitate variază cu cantitatea lor. Taninurile sunt heterozide fenolice, a căror parte numită aglicon este mai adesea acidul galic.

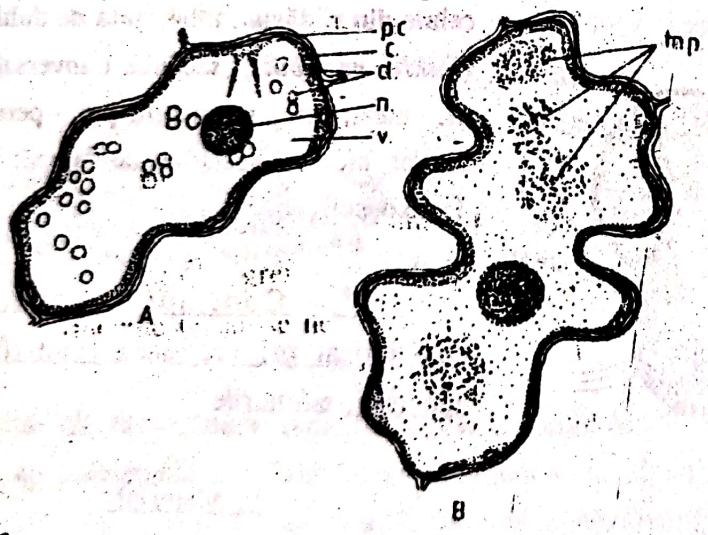


Fig. 58. Celule din epiderma inferioară a pinulei frondei de feriguţă (*Polypodium vulgare*): fără tanin (A), cu tanin precipitat în vacuolă (B), observate de faţă; c. - citoplasmă; cl. - cloroplaste; n. - nucleu; p.c. - perete celular; tn.p. - tanin precipitat; v. - vacuolă (d. Savouré, Verger-Lagadec)

F. Remarci:

▸ Montajul în apă a unui fragment proaspăt din epiderma inferioară pinulei frondei de feriguţă permite a observa celulele înaintea acţiunii reactivului şi constituie un martor valabil; celulele epidermice au toate o vacuolă optic vidă; taninurile prezente în soluţie coloidală nu sunt vizibile;

▸ Experienţa poate fi realizată în aceleaşi condiţii, folosind un alt reactiv: cafeina în soluţie apoasă 0,5 %. În acest caz apar în vacuolă granule cenuşii, de talie variabilă şi animate

Scanned with OKEN Scanner

de mişcări browniene. Acestea sunt precipitate de taninuri, formate de cafeina care a pătruns în vacuola celulei (a se vedea **Capitolul V - PERMEABILITATEA CELULARĂ**).

3. Evoluţia sistemului vacuolar

Sistemul vacuolar evoluează, în principal, în funcţie de gradul de hidratare a celulelor. În plantă, celulele care suferă o puternică penetrare a apei, sunt cele ce sunt situate în organe în creştere; de exemplu, în rădăcina tânără a plantulei de grâu. Foarte adesea, în seminţe, după a perioadă de deshidratare, în cursul maturării lor, ele se rehidratează când sunt puse la germinat: de exemplu, în sămânţa de ricin.

1°. Evoluţia vacuolelor într-un organ în creştere

A. Material

- Rădăcini tinere de la plantule de grâu (***Triticum aestivum***, fam. *Poaceae*). Boabele (cariopse) de grâu, netratate, sunt puse la germinat pe un mediu umed, la temperatura ambiantă sau în etuvă, la 18° C. Când rădăcinile plantulelor au lungimea totală de 0,5-1 cm, ele sunt utilizabile.

B. Reactiv:

Roşu neutru 0,05 %, dizolvat în apă

C. Protocol experimental:

Se taie cu foarfecele extremitatea de 0,5-1 cm lungime; se imersează în reactiv, timp de 1 minut. Se montează fie în apă, fie în soluţie de roşu neutru, între lamă şi lamelă.

Se întinde şi se striveşte uşor şi uniform materialul din preparat, ajutându-ne de o a doua lamă, plasată perpendicular pe prima. Se observă şirurile de celule. Trebuie avut în vedere ca prin strivire să se păstreze celulele vii mai multă vreme.

D. Observaţii:

Mai întâi este necesar să se localizeze, pe unul sau mai multe şiruri de celule, diferitele stadii ale diferenţierii celulare, plecând de la starea meristematică. În această regiune celulele au o formă particulară, deoarece, în plan optic ele apar mai largi (late) decât înalte (lungi). Pe măsură ce se îndepărtează de această zonă celulele devin izodiametrice, apoi progresiv mai lungi (înalte) decât largi (late). Aceste forme corespund unor regiuni de dezvoltare precise: de la regiunea meristematică (de diviziune celulară), se trece la cea de elongaţie (alungire) celulară, apoi la cea a celulelor diferenţiate (adulte) (Fig. 59).

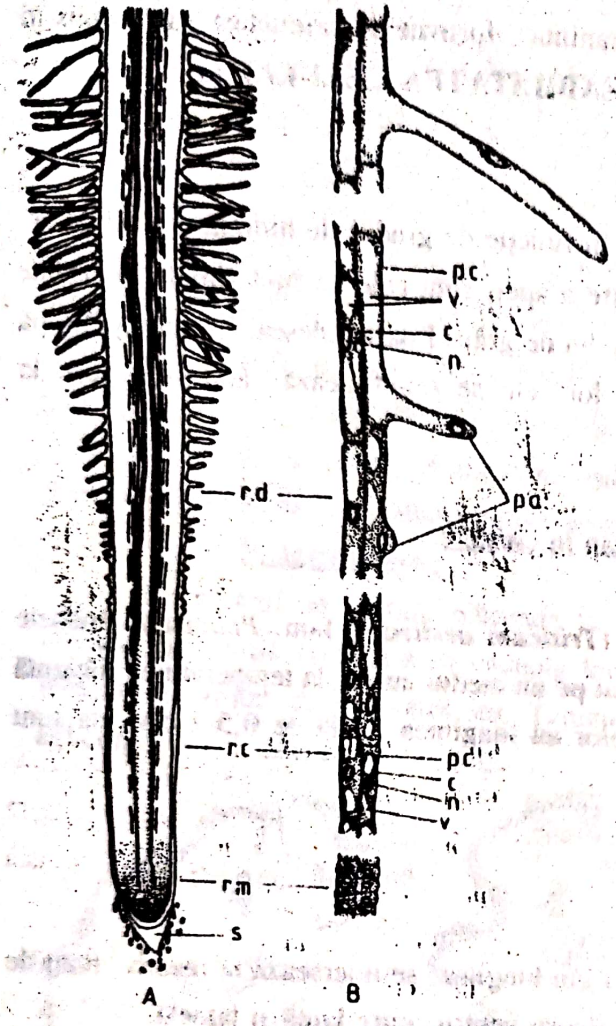


Fig. 59. Evoluţia sistemului vacuolar din celule în diferite stadii de diferenţiere, de-a lungul vârfului rădăcinii de grâu (*Triticum aestivum*), secţiuni transversale: schemă (A) , detalii (B); c. - citoplasmă; n. - nucleu; p.a. - peri absorbanţi; p.c. - perete celular; r.c. - regiune de creştere; r.d. - regiune definitivă; r.m. - regiune meristematică; s. - scufie; v. - vacuolă (d. Trankovski)

♦ Regiunea meristematică:

Celulele prezintă, în interiorul hialoplasmei fin granuloase şi necolorate, vacuole globuloase, mici, foarte numeroase, colorate în roz-violaceu de către reactiv. Fiecare vacuolă este înconjurată de tonoplast. Nucleul este foarte voluminos, necolorat, parţial mascat de vacuole. Peretele celular, de natură pectocelulozică, este foarte subţire.

♦ Regiunea de elongaţie celulară:

Se pot observa cel puţin două tipuri de celule: unèle de formă pătrată, altele mai înalte decât late. Vacuolele, de volum foarte inegal, sunt colorate în roşu. Această caracteristică este accentuată în al doilea tip de celule: inegalitatea în volum este frapantă, iar coloraţia este mai palidă (adesea roz). Nucleul este mascat de vacuole.

♦ Regiunea celulelor diferenţiate (adulte):

1. Celulele apropiate de secţiunea practicată sunt foarte înalte. Nucleul granulos este adesea văzut de faţă, într-o citoplasmă necolorată. Vacuola ocupă cea mai mare parte din volumul celular; ea este adesea resecţionată (reîmpărţită) de tractusuri citoplasmatice; culoarea sa este roz palid sau roşu-oranj.

Scanned with OKEN Scanner

2. Celulele izolate ale scufiei sunt alungite, cu extremităţile rotunjite. Peretele este constituit numai dintr-o singură îngroşare de celuloză. În citoplasma granuloasă, împinsă lângă acesta din urmă, nucleul este foarte net: rotunjit, văzut de faţă sau lenticular, văzut din profil. În plus, se observă mici granule de amidon, incolore, care vor juca rol de statolite în geotropismul pozitiv al rădăcinii. Vacuola este enormă, colorată în roşu-oranj, delimitată de tonoplast; în interiorul ei se formează adesea precipitate de culoare roşie intensă, datorită acţiunii reactivului. Ele sunt în legătură cu taninurile vacuolare.

E. Interpretare:

Diferitele tipuri de celule corespund unor regiuni bine precizate. Există, evident, forme de trecere de la o regiune la alta, diferenţierea celulară făcându-se progresiv de la regiunea meristematică până la cea a celulelor adulte.

Roşul neutru este un colorant vital al celulei; el este, de asemenea, colorantul specific al vacuolei; în plus, este un indicator de pH în ceea ce priveşte sucul vacuolar; într-adevăr, în funcţie de valoarea pH-ului din mediu, culoarea se schimbă de la violacee (pH = 1 - suc vacuolar acid) până la galbenă (pH = 8 - suc vacuolar bazic).

Se poate spune că în regiunea meristematică sucul vacuolar este acid (culoare roz-violacee); în regiunea de elongaţie este neutru (culoare roşiatică). Culoarea roz-palid obţinută uneori este datorită faptului că cele mai mari vacuole sunt puternic hidratate, ceea ce provoacă o diluare a culorii. În sfârşit, în celulele adulte sucul vacuolar este bazic.

Respectând sensul diferenţierii celulare se constată o evoluţie a sistemul vacuolar: diminuarea numărului şi mărirea volumului lor prin hidratarea progresivă a sucului vacuolar şi prin fuziunea vacuolelor între ele. În consecinţă, într-un organ în creştere, vacuolele mici şi numeroase în celulele foarte tinere se hipertrofiază şi fuzionează pentru a constitui o singură vacuolă în celulele adulte.

2°. Evoluţia vacuolelor într-o sămânţă complet matură: termenul final al evoluţiei

A. Material:

- Seminţe de ricin (***Ricinus communis***, fam. *Euphorbiaceae*)

B. Reactiv:

Lugol

C. Protocol experimental:

Se îndepărtează cele două tegumente ale seminţei: cel extern brun-marmorat şi dur, cel

Scanned with OKEN Scanner

intern albicios şi subţire. Se descoperă astfel albumenul alb. Se fac secţiuni transversale subţiri, cu ajutorul briciului; se imersează timp de 5 minute într-o sticlă de ceas cu lugol, apoi sunt montate în acelaşi reactiv, între lamă şi lamelă.

D. Observaţii:

Albumenul este constituit din celule parenchimatice. În ele se disting corpuri structurate; acestea sunt granule de aleuronă sau corpusculi proteici. Fiecare este format dintr-o parte poliedrică sau cristaloid, colorat în brun-acaju de către lugol, ce poate fi fragmentat în două sau trei părţi. El se învecinează cu unul sau două corpuri rotunjite, mai mici şi necolorate: aceştia sunt globoizii. Cei doi constituenţi sunt incluşi într-o masă fundamentală sau matrice, colorată în galben şi delimitată la exterior de o membrană simplă. În hialoplasma celulei nu se observă vacuole, ci lipide gălbui (ulei) sub formă de picături mai mult sau mai puţin voluminoase şi înglobând adesea câteva granule de aleuronă; observând cu atenţie marginile secţiunii, se remarcă astfel de picături lipidice şi la exteriorul celulei; ele se aglutinează pentru a forma importante suprafeţe de ulei (Fig. 60).

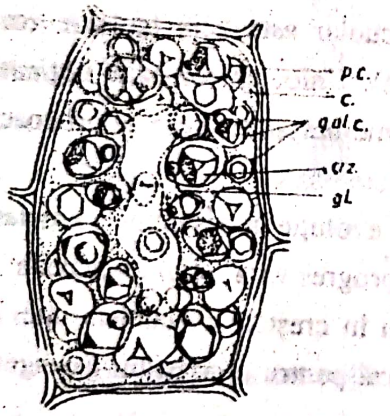


Fig. 60. Granule de aleuronă compuse într-o celulă din albumenul seminţei mature de ricin (*Ricinus communis*), secţiune transversală; **c.** citoplasmă, **crz.** cristaloid; **gl.** - globoid; **g.al.c.** granule de aleuronă compuse; **p.c.** - perete celular (d Savouré şi Verger-Lagadec)

E. Interpretare:

Globoidul granulei de aleuronă este constituit din fitină (ester fosforic al unui polialcool ciclic - inozitolul, combinat cu calciu şi magneziu). Cristaloidul conţine proteine de rezervă de tipul globulinei. Masa fundamentală este constituită din proteine de tipul albuminei, din care Ricina D - corp toxic - este inhibitor puternic al sintezei proteice.

Aceste granule de aleuronă reprezintă vacuole deshidratate: este ceea ce se doreşte a se demonstra prin experienţa următoare

3⁰ Evoluţia vacuolelor într-o sămânţă în curs de germinare

A. Material:

- Seminţe de ricin (***Ricinus communis,*** fam. ***Euphorbiaceae***)

Scanned with OKEN Scanner

B. Reactiv:

Roşu neutru 0,001 %, dizolvat în apă

C. Protocol experimental

Seminţele sunt puse la germinat pe mediu umed, la temperatura ambiantă sau în etuvă la 20° C. Se prelevează în diferite momente ale germinării lor, astfel încât să se urmărească evoluţia granulelor de aleuronă (de ex. când rădăcinile tinerelor plantule au lungimi cuprinse între 3 mm şi 2 cm). În aceste condiţii seminţele sunt decorticate şi se execută secţiuni transversale subţiri prin albumenul de culoare alb-gălbuie. Se colorează seminţele cu roşu neutru, timp de 5-10 minute. Se montează în acelaşi reactiv, între lamă şi lamelă.

E. Interpretare:

În timpul germinării, fitina globoidului şi proteinele cristaloidului sunt degradate prin hidroliză. Matricea ar putea conţine enzimele hidrolitice responsabile de acest fenomen. Coloraţia progresivă cu roşu neutru arată natura sa vacuolară. Micile vacuole formate în cursul germinării, în fiecare granulă de aleuronă, fuzionează între ele şi constituie o singură vacuolă, delimitată de tonoplast, membrana simplă a granulei de aleuronă. Prin hidratare progresivă, se formează, în fiecare celulă parenchimatică a albumenului, o singură vacuolă mare (Fig. 61 A).

Invers, în cursul maturării seminţei, vacuola fiecărei celule se deshidratează şi se fragmentează din ce în ce mai mult. Proteinele precipită şi, astfel, se constituie granula de aleuronă (Fig. 61 B).

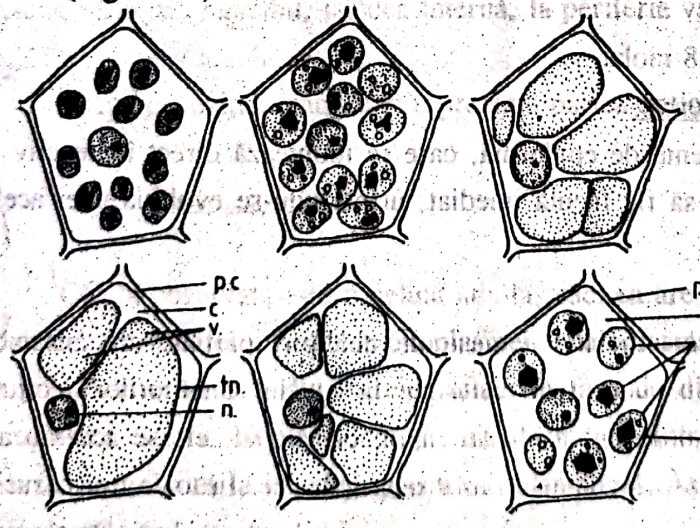


Fig. 61. Evoluţia sistemului vacuolar în celule din albumenul seminţei de ricin (*Ricinus communis*): în curs de germinare (A), pe parcursul maturării (B), secţiuni transversale; c. - citoplasmă; g.al.c.- granule de aleuronă compuse; n. - nucleu; p.c. - perete celular; tn. - tonoplast; v. - vacuole (d.Buvat)

CAPITOLUL V

PERMEABILITATEA CELULARĂ

Celule vegetale, unităţi vii, au importante funcţii de schimburi: pe de pe parte, de la celule la celule, la nivelul ţesuturilor, pe de altă parte, cu mediul extern înconjurător.

Aceste schimburi pun în joc structuri celulare: peretele şi membranele biologice în mod deosebit, care pot fi sau nu permeabile.

Se studiază două tipuri de schimburi sau de permeabilitate: permeabilitatea pentru apă şi permeabilitate pentru substanţe dizolvate.

1. Permeabilitatea pentru apă

Schimburile de apă pot avea loc în sensul celulă-mediu extern sau în sens invers: în primul caz se produce fenomenul de plasmoliză, iar în al doilea caz, cel de deplasmoliză.

1.1. Plasmoliza

1° Studiul celulei vii

A. Material:

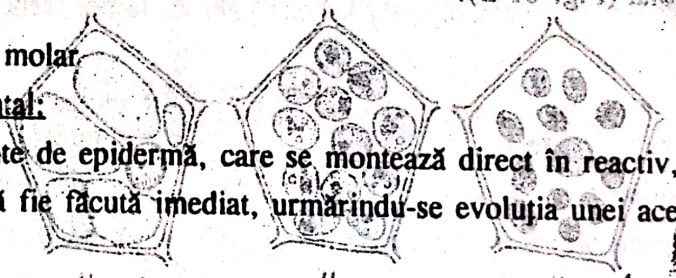
- Epiderma superioară (internă) a unei tunici mijlocii din bulbul de ceapă (*Allium cepa*, fam. *Liliaceae*)

B. Reactiv:

Nitrat de potasiu (KNO_3) 0,8 molar

C. Protocol experimental:

Se prelevează câteva fragmente de epidermă, care se montează direct în reactiv, între lamă şi lamelă. Observaţia trebuie să fie făcută imediat, urmărindu-se evoluţia unei aceleaşi celule.



D. Observaţii:

Începând din primele minute, au loc o serie de dezlipiri parţiale ale ansamblului plasmalemă-citoplasmă-tonoplast. Ele sunt întâi *concave* la nivelul unghiurilor (colţurilor) celulare şi în lungul celor mai lungi pereţi ai celulei; apoi, cu timpul, ele se accentuează şi sfârşesc prin forme *convexe*; formele intermediare sunt *semi-convexe*. În toate trei cazurile se observă o micşorare a volumului vacuolei; acesta este fenomenul de plasmoliză. De asemenea, citoplasma se retractă şi plasmalema se dezlipeşte. Spaţiul provocat de dezlipiri apare optic vid;

aceasta permite să se localizeze concret citoplasma şi face să se evite a se lucra pe celule în stare necorespunzătoare (celule care ar fi plasmolizat şi ar fi devenit moarte prin ruperea plasmalemei). După 20 de minute, plasmoliza nu mai evoluează; se poate totuşi nota prezenţa de zone de contact a citoplasmei cu cea a celulelor vecine, la nivelul punctuaţiilor peretelui, prin intermediul tractusurilor citoplasmatice şi al filamentelor lui Hecht; pe de altă parte, retractarea citoplasmei spre interiorul volumului celular lasă în urma ei şi în legătură cu ea mici "bule" citoplasmatice; mai mult, vacuola poate să se fragmenteze adesea în două sau trei părţi, de volum inegal, după talia celulei (Fig. 62).

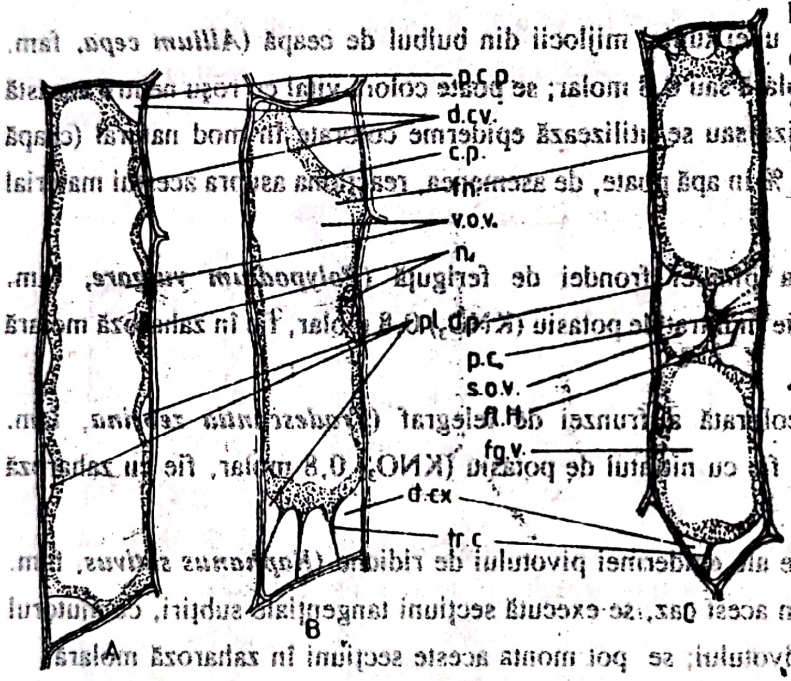


Fig.62. Plasmoliza celulelor din epiderma superioară a unei tunici din bulbul de ceapă (*Allium cepa*): concavă (A), semiconvexă (B), convexă cu fragmentarea vacuolei (C), secţiuni superficiale; c.p. - citoplasmă parietală; d.c.v. - desprindere concavă; d.cx - desprindere convexă; fg.v. - fragment de vacuolă; fl.H. - filamentele lui Hecht; n. - nuclei; p.c. - "picătură" de citoplasmă p.c.p. - perete celulozo-pectic; pl.d.p. - plasmalemă desprinsă de perete; s.o.v. - spaţiu optic vid; tn. - tonoplast; tr.c. - tractusuri citoplasmatice; v.o.v. - vacuolă optic vidă (d. Savouré şi Verger-Lagadec)

E. Interpretare:

Micşorarea volumului vacuolar, în cazul de faţă, este consecinţa schimburilor de apă între celulă şi mediul extern. Migrarea apei se face spre exterior; ea se supune legilor osmozei: când două medii, de concentraţie diferită, sunt separate de o barieră semipermeabilă, apa migrează din mediul mai puţin concentrat spre cel care are o concentraţie mai ridicată. Concentraţia vacuolară $[C]_v$ este deci inferioară celei a mediului extern $[C]_E$. Cea a mediului extern este hipertonică, cealaltă, vacuolară este hipotonică. Deci $[C]_E > [C]_v$. Bariera semipermeabilă este constituită de citoplasmă, delimitată de cele două membrane biologice ale sale (plasmalema şi tonoplastul). Izotonia este atinsă când cele două concentraţii sunt identice, deci când $[C]_E =$

Scanned with OKEN Scanner

$[C]_V$. Acesta este sfârşitul plasmolizei.

Când mediul extern este prea concentrat în raport cu vacuola are loc o plasmoliză brutală a celulei; aceasta antrenează o dezlipire totală a citoplasmei de perete şi o fragmentare a hialoplasmei: aceasta este starea de *merotomie*.

F. Remarci:

Fenomenul de plasmoliză poate fi experimentat şi pe alte materiale vegetale şi cu alţi reactivi.

▸ Epiderma superioară a unei tunici mijlocii din bulbul de ceapă (*Allium cepa*, fam. *Liliaceae*) montată în zaharoză molară sau 0,8 molar; se poate colora vital cu roşu neutru această epidermă înainte de a o plasmoliza sau se utilizează epiderme colorate în mod natural (ceapă roşie). Clorura de sodiu (NaCl) 5 % în apă poate, de asemenea, reacţiona asupra acestui material (celulele mor destul de rapid).

▸ Epiderma inferioară a pinulei frondei de feriguţă (*Polypodium vulgare*, fam. *Polypodiaceae*), montată direct, fie în nitrat de potasiu (KNO_3) 0,8 molar, fie în zaharoză molară sau 0,8 molar.

▸ Epiderma inferioară colorată a frunzei de telegraf (*Tradescantia zebrina*, fam. *Commelinaceae*), pusă în contact fie cu nitratul de potasiu (KNO_3) 0,8 molar, fie cu zaharoză molară sau 0,8 molar.

▸ Se pot plasmoliza celule ale epidermei pivotului de ridiche (*Raphanus sativus*, fam. *Brassicaceae*), colorate în roşu. În acest caz, se execută secţiuni tangenţiale subţiri, cu ajutorul briciului, în părţile colorate ale pivotului; se pot monta aceste secţiuni în zaharoză molară.

Această listă nu este totuşi limitativă.

2° *Studiul celulei fixate*

A. Material:

• Epiderma superioară (internă) a unei tunici mijlocii din bulbul de ceapă (*Allium cepa*, fam. *Liliaceae*).

B. Reactivi:

Fixator

Nitrat de potasiu (KNO_3) 0,8 molar

C. Protocol experimental:

Se imersează fragmente de epidermă în fixator, timp de 2 minute. Se spală rapid cu apă,

Scanned with OKEN Scanner

apoi se elimină excesul de fixator. Se montează în nitrat de potasiu, între lamă şi lamelă.

D. Observaţii:

Nu are loc nici o plasmoliză, nici o mişcare a citoplasmei.

Hialoplasma şi nucleoplasma sunt coagulate şi de culoare gălbui. În volumul celular apar spaţii optic vide, care corespund amplasării vacuolei, traversată uneori de tubercule citoplasmatice fixate şi colorate în galben. Nucleul poate fi văzut din faţă sau din profil (Fig. 63).

E. Interpretare:

Celulele au fost fixate în stare turgescentă. S-a încercat a le plasmoliza montându-le în nitrat de potasiu 0,8 molar; ele nu au plasmolizat: membranele biologice sunt distruse; celulele sunt moarte.

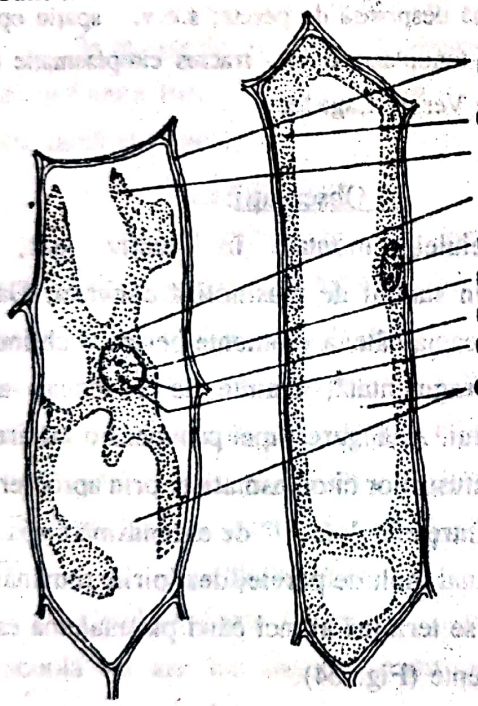


Fig. 63. Încercare de plasmoliză după fixarea celulelor din epiderma superioară a unei tunici din bulbul de ceapă (*Allium cepa*), secţiuni superficiale; **a.v.** - amplasamentul vacuolei; **c.p.f.** - citoplasmă parietală fixată; **c.pn.f.** - citoplasmă perinucleară fixată; **c.tr.f.** - citoplasmă trabeculară fixată; **n.v.fţ.** - nucleu văzut de faţă; **n.v.pr.** - nucleu văzut din profil; **nc.f.** - nucleoli fixaţi; **np.f.** - nucleoplasmă fixată (d. Savouré şi Verger-Lagadec)

1:2 Deplasmoliza

1° Studiul celulei vii

A. Material

● Epiderma superioară (internă) a unei tunici mijlocii din bulbul de ceapă (*Allium cepa*, fam. *Liliaceae*)

B. Reactiv:

Nitrat de potasiu (KNO_3) 0,8 molar

C. Protocol experimental

Pentru a putea deplasmoliza celulele, trebuie mai întâi să le plasmolizăm, prin imersarea în reactiv, timp de cel puţin 5 minute. Apoi se montează materialul în KNO_3. Observaţia

Scanned with OKEN Scanner

evidenţiază celule în stare de plasmoliză. Apoi se adaugă apă sub lamelă pentru a dilua mediul de montaj.

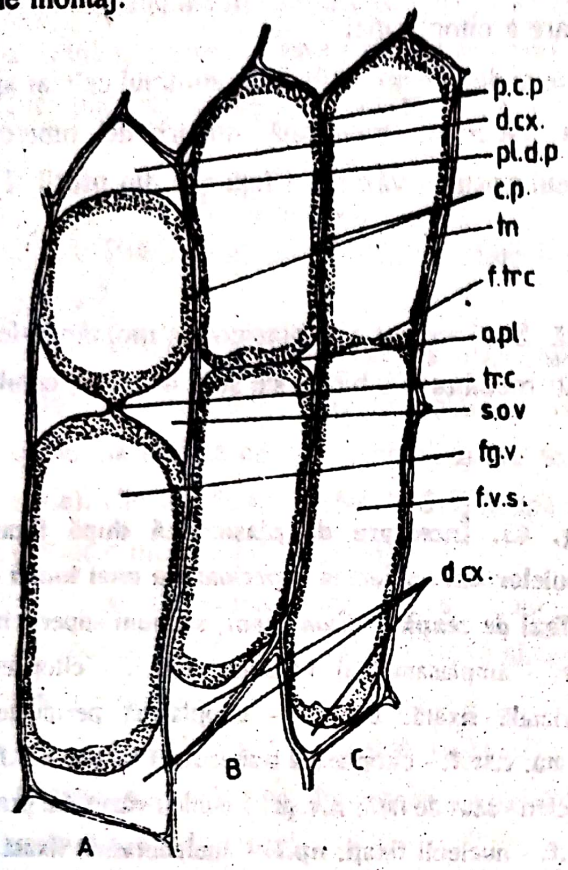


Fig. 64. Deplasmoliza celulelor din epiderma superioară a unei tunici din bulbul de ceapă (*Allium cepa*): plasmoliză convexă cu fragmentarea vacuolei **(A)**, deplasmoliză progresivă **(B, C)**, secţiuni superficiale; **a.pl.** - apropierea plasmalemelor; **c.p.** - citoplasmă parietală; **d.cx.** - desprinderi convexe; **f.tr.c.** - formarea unui tractus citoplasmatic; **f.v.s.** - formarea unei vacuole separate; **fg.v.** - fragment de vacuolă; **p.c.p.** - perete celulozo pectic; **pl.d.p.** - plasmalemă desprinsă de perete; **s.o.v.** - spaţiu optic vid; **tn.** - tonoplast; **tr.c.** - tractus citoplasmatic (d. Savouré şi Verger-Lagadec)

D. Observaţii:

Celulele montate în reactiv sunt, în general, în stadiul de plasmoliză convexă. Dacă nu, se aşteaptă câteva momente pentru a obţine o vacuolă fragmentată, înainte de a adăuga apă preparatului. Adăugarea apei provoacă o mărire a volumului vacuolei; se urmăreşte o scurtare datorită tractusurilor citoplasmatice, prin apropierea fragmentelor vacuolare, care în cele din urmă se ating. Între ele, "vârful" de citoplasmă dispare. Apoi, citoplasma polilor celulei se apropie din ce în ce mai mult de perete, dezlipirile rămânând convexe. Acesta este fenomenul de deplasmoliză, care se termină atunci când plasmalema este total desprinsă de perete. Atunci celulele devin turgescente (Fig. 64).

E. Interpretare:

Umflarea vacuolei se datorează intrării apei în ea: mediul extern devine hipotonic, prin diluare, în raport cu mediul vacuolar hipertonic: $[C]_E < [C]_V$. După legile osmozei, are loc pătrunderea apei în vacuolă. Când este atinsă izotonia, fenomenul de migrare a apei se opreşte.

Dacă după plasmoliza celulelor, în loc de a dilua progresiv mediul extern, se imersează fragmentul de epidermă într-un mediu foarte hipotonic (de ex. apă pură), apa pătrunde brusc în

Scanned with OKEN Scanner

vacuolă. Aceasta se umflă fără măsură; partea vie a celulei plesneşte; peretele poate chiar să se deformeze; aceasta este fenomenul de *citoliză*.

2° *Studiul celulei fixate*

A. Material

- Epiderma superioară (internă) a unei tunici mijlocii din bulbul de ceapă (*Allium cepa*, fam. *Liliaceae*)

B. Reactiv:

Nitrat de potasiu (KNO_3) 8,0 molar

Fixator

C. Protocol experimental:

Se imersează în nitrat de potasiu fragmente proaspete de epidermă. După 10 minute se trec în fixator timp de 2 minute. Se spală rapid cu apă, apoi se montează într-o picătură de apă, între lamă şi lamelă.

D. Observaţii:

Asemenea celule nu mai prezintă ciclioză; deci ele sunt moarte. Încercarea de deplasmoliză asupra celulelor fixate în stare plasmolizată este nereuşită. Nucleoplasma se coagulează şi se colorează în galben, ca şi citoplasma; aceasta din urmă se prezintă adesea ca o bandă ondulată, de grosime variabilă, situată în interiorul celulei, la o anumită distanţă de perete. La exteriorul citoplasmei, anumite părţi optic vide corespund amplasării dezlipirilor, determinate prin plasmoliză, în timpul imersării în nitrat; celelalte, la mijlocul masei citoplasmatice, corespund amplasării vacuolei sau a fragmentelor de vacuolă (Fig. 65).

E. Interpretare:

Celulele fixate în stare plasmolizată nu pot să se deplasmolizeze. Pătrunderea apei în vacuolă nu are loc datorită distrugerii membranelor biologice ale celulei (plasmalema şi tonoplastul): celulele sunt moarte.

Variaţiile volumului vacuolar se datoresc schimburilor de apă între mediul extern şi mediul intracelular. Aceste migrări de apă au loc de la vacuolă spre mediul extern: celulele plasmolizează; ele au loc şi în sens invers: celulele deplasmolizează. Acest fenomen de difuzie a apei sau de osmoză nu are loc decât dacă cele două medii considerate au concentraţii diferite; pe de altă parte, el nu are loc decât în celulele vii. Acesta constituie un criteriu al stării vitale a celulei.

Scanned with OKEN Scanner

Fenomenele de plasmoliză şi de deplasmoliză sunt reversibile atâta vreme cât citoplasma păstrează puncte de legătură, la nivelul punctuaţiilor peretelui, cu cea a celulelor vecine (tractusuri citoplasmice, filamente ale lui Hecht). Schimburile de apă se opresc când concentraţiile sunt egale de o parte şi de alta a "barierei" semipermeabile, constituită de citoplasmă, delimitată ea însăşi de plasmalemă şi tonoplast.

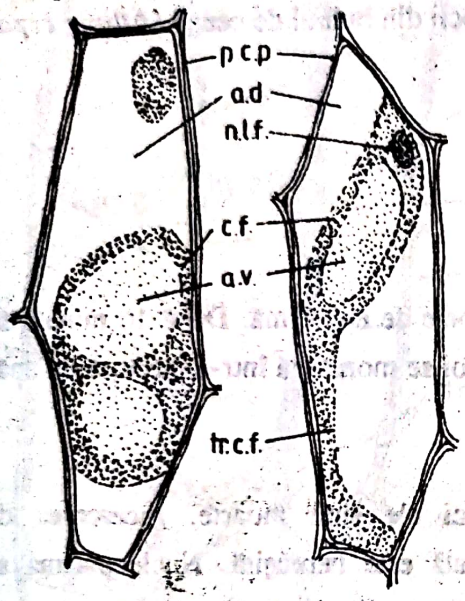


Fig. 65. Încercare de deplasmoliză după fixarea celulelor din epiderma superioară a unei tunici din bulbul de ceapă (*Allium cepa*), secţiuni superficiale; a.d. - amplasarea desprinderilor; a.v. - amplasarea vacuolelor; c.f. - citoplasmă fixată; n.l.f. - nucleu lenticular fixat; p.c.p. - perete celulozo-pectic; tr.c.f. - tractus citoplasmatic fixat (d. Savouré şi Verger-Lagadec)

2. Permeabilitatea pentru substanţe dizolvate

Schimburile de substanţe dizolvate privesc pătrunderile acestor substanţe în citoplasmă şi în vacuolă.

2.1. Pătrunderea substanţelor dizolvate în citoplasmă

A. Material:

- Epiderma superioară (internă) a unei tunici mijlocii din bulbul de ceapă (***Allium cepa***, fam. *Liliaceae)*

B. Reactiv:

Soluţie de sulfocianură de potasiu sau tiocianat de potasiu (KSCN) 0,8 molar.

C. Protocol experimental:

Se montează un fragment de epidermă direct în reactiv, între lamă şi lamelă; se observă imediat la un măritor puternic.

D. Observaţii:

Se asistă progresiv la modificări ale morfologiei şi structurii citoplasmei şi nucleului.

Într-un prim stadiu (după 1 minut): se produc dezlipiri convexe ale plasmalemei de perete, cu diminuarea volumului vacuolei; aceasta este *plasmoliza clasică*. Nucleul, de volum normal, este granulos.

Într-un al doilea stadiu (după 5 minute): volumul vacuolar rămâne constant, iar masa

Scanned with OKEN Scanner

citoplasmatică se umflă la polii celulei; nucleul se hipertrofiază, devenind optic vid; el pare să constituie o hernie la nivelul vacuolei sau se găseşte adesea împins la una din extremităţile celulei; atunci el ia formă foarte alungită, conică, între cele două membrane biologice; aceasta este aşa numita *plasmoliza "în boneţă"*.

În cursul celui de al treilea stadiu (după 10 minute): volumul vacuolar rămânând în continuare constant, are loc o ruptură a plasmalemei, ceea ce are drept consecinţă dispersarea hialoplasmei în dezlipirile convexe; o singură membrană biologică rămâne intactă: tonoplastul; aceasta este aşa numita *plasmoliza "în butoi"*; nucleul hipertrofiază, devenind granulos; el reia o formă rotunjită.

Anvelopa nucleară plesneşte după un timp relativ lung şi celula moare (Fig. 66).

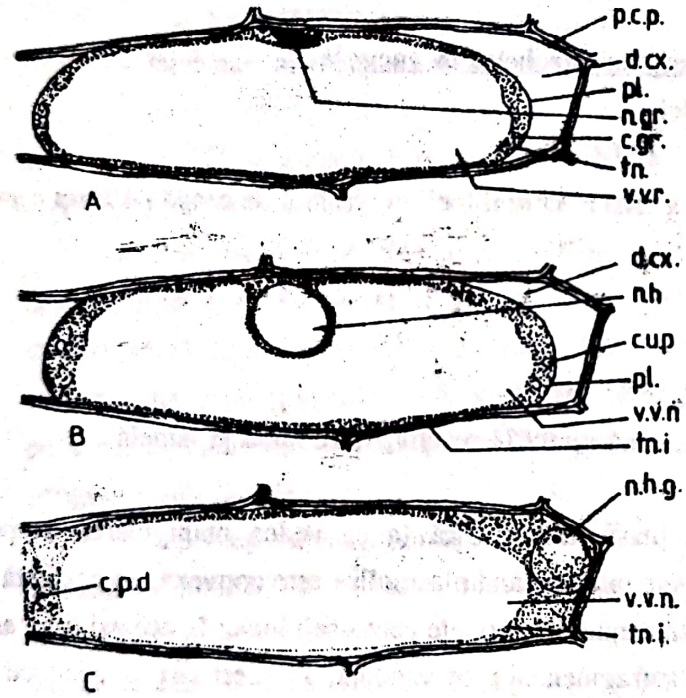


Fig. 66. Penetrarea substanţelor dizolvate în citoplasma celulelor din epiderma superioară a unei tunici din bulbul de ceapă (*Allium cepa*) (cazul ionului SCN^-): plasmoliză convexă (A), "în boneţă" (B), "în butoi" (C), secţiuni superficiale; c.gr. - citoplasmă granulară; c.p.d. - citoplasmă perforată şi dispersată; c.u.p. - citoplasmă umflată şi perforată; d.cx. - desprindere convexă; n.gr. - nucleu granular; n.h. - nucleu hipertrofiat; n.h.g. - nucleu hipertrofiat şi granular; p.c.p. - perete celulozo-pectic; pl. - plasmalemă; tn. - tonoplast (i. - intact); v.v.n. - vacuolă de volum neschimbat; v.v.r. - vacuolă de volum redus (d. Savouré şi Verger Lagadec)

E. Interpretare:

La început se observă o plasmoliză clasică. Se atinge rapid izotonia, adică o egalitate a concentraţiilor între mediul extern şi vacuolă. Volumul vacuolei, dobândit la sfârşitul primului stadiu, rămâne neschimbat până la sfârşitul experienţei. Deci, nu mai au loc schimburi între apa

Scanned with OKEN Scanner

vacuolei şi mediul extern.

Pe de altă parte are loc o hipertrofie anormală a citoplasmei, mai ales la polii celulei. Aceeaşi situaţie se remarcă şi pentru nucleu. Ionul SCN^- pătrunde în aceste structuri, traversând plasmalema şi anvelopa nucleară; el denaturează proteinele, măreşte gradul de imbibiţie a citoplasmei şi a nucleoplasmei cu moleculele de apă. Tonoplastul opreşte intrarea ionilor SNC^-. Se realizează un fenomen de permeabilitate selectivă, la nivelul acestei membrane biologice. Mărirea volumului citoplasmei şi nucleului este atât de puternică încât are loc ruperea plasmalemei şi a anvelopei nucleare.

Ionii SNC^- devin din ce în ce mai toxici pentru celulă şi starea acesteia devine letală, ceea ce antrenează moartea sa.

De subliniat că această experienţă nu este realizabilă decât dacă celulele sunt plasmolizate; dată fiind acţiunea nocivă a cianurilor, manipularea se derulează la limita vieţii celulare.

2.2. Pătrunderea substanţelor dizolvate în vacuolă

1°Pătrunderea acetamidei

A. Material:

- Epiderma superioară (internă) a unei tunici mijlocii din bulbul de ceapă (*Allium cepa*, fam. *Liliaceae*)

B. Reactiv:

Soluţie de acetamidă 2,5 molar

C. Protocol experimental:

Se montează un fragment de epidermă direct în reactiv, între lamă şi lamelă.

D. Observaţii:

Se poate urmări, mai întâi, o plasmoliză clasică (a se vedea manipularea asupra plasmolizei). După aproximativ 10 minute, atunci când plasmoliza este convexă, se constată o apropiere foarte netă şi progresivă a plasmalemei de peretele pecto-celulozic; în acelaşi timp are loc o mărire a volumului vacuolei sau a fragmentelor de vacuolă. În acest caz se produce o deplasmoliză spectaculoasă, relativ rapidă; această rapiditate împiedică o bună observaţie; este necesar, în această situaţie de a proceda la montaje succesive (Fig. 64).

E. Interpretare:

La început, când plasmoliza este convexă, au loc schimburi de apă, ce se realizează de la vacuolă spre mediul extern, deoarece $[C]_E > [C]_V$. Apoi, se atinge izotonia când $[C]_E = [C]_V$.

Scanned with OKEN Scanner

Ulterior se produce o deplasmoliză. În acest caz mediul vacuolar devine hipertonic în raport cu mediul exterior hipotonic: aceasta nu se poate realiza decât prin pătrunderea progresivă a acetamidei în vacuolă; inversarea concentraţiilor antrenează, de asemenea, o pătrundere de apă. Datorită acestui fapt citoplasma este reîmpinsă pe lângă peretele scheletic; se produce un fenomen de deplasmoliză spontană, apoi o revenire la starea finală de turgescenţă.

Acetamida pătrunde deci în vacuolă după ce traversează citoplasma delimitată de cele două membrane biologice ale sale. Aceasta este o substanţă organică cu greutate moleculară mică (gr. mol = 59), având formula $CH_3 - \underset{\displaystyle NH_2}{\overset{\displaystyle |}{C}} = O$; este foarte solubilă în lipide, datorită prezenţei unui radical metil $-CH_3$. Ea traversează deci plasmalema şi tonoplastul, membrane biologice bogate în lipide.

F. Remarci:

▸ Rezultate analoage sunt obţinute cu alţi reactivi: formamida 2,5 molar ($H - \underset{\displaystyle NH_2}{\overset{\displaystyle |}{C}} = O$; gr. mol. = 45) şi ureea 0.8 molar ($CO -(NH_2)_2$; gr. mol. = 60). În acest ultim caz nu se produce deplasmoliza decât după o oră de contact.

▸ Protocolul experimental poate fi modificat, după cum urmează, pentru a observa o deplasmoliză lentă. Se imersează timp de 15 minute fragmente proaspete din epiderma superioară de la o tunică mijlocie din bulbul de ceapă, într-o sticlă de ceas cu zaharoză 0,8 molar. Montajul realizat între lamă şi lamelă, în acest reactiv, ne arată o plasmoliză lentă a celulelor. Apoi, chiar pe acest preparat se pune acetamidă 2,5 molar sau formamidă 2,5 molar, făcând-o să treacă progresiv sub lamelă.

Cât priveşte ureea, montajul se face direct în reactiv, între lamă şi lamelă; se observă o plasmoliză imediată a celulelor: acesta este stadiul iniţial. Pe de altă parte, dat fiind faptul că deplasmoliza nu se produce decât după cel puţin o oră, este bine de a se imersa materialul într-o sticlă de ceas conţinând acest reactiv, având grijă de a o acoperi. Se pot preleva fragmente înainte de sfârşitul timpului necesar, care pot fi puse direct în uree, aşa încât se poate observa deplasmoliza spontană.

2⁰ Pătrunderea cafeinei

A. Material

● Frunză (frondă) de feriguţă (*Polypodium vulgare*, fam. *Polypodiaceae*)

Scanned with OKEN Scanner

B. Reactiv:

Soluţie apoasă de cafeină 0,5 % (sau 0,02 molar)

C. Protocol experimental

Se face o incizie oblică şi superficială în epiderma inferioară a unui segment (pinulă) al frondei cu ajutorul unei lame de ras; pornind de la tăietură, cu ajutorul unei pensete fine, se detaşează o bucată translucidă. Se montează în reactiv, între lamă şi lamelă.

D. Observaţii:

În celulele epidermice apar numeroase granule intravacuolare, cenuşii şi de talie diferită; cele mai mici sunt animate de mişcări browniene. Acestea sunt particulele unui precipitat de taninuri, care se întâlnesc şi în celulele stomatice (Fig. 67).

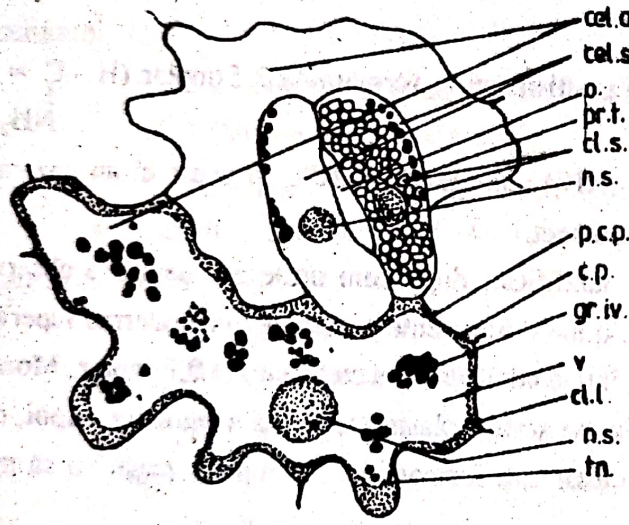


Fig. 67. Penetrarea substanţelor dizolvate în vacuola celulelor din epiderma frondei de feriguţă (*Polypodium vulgare*), secţiune superficială; **c.p.** - citoplasmă parietală; **cel.a.** - celule anexe; **cel.st.** - celule stomatice; **cl.l.** - cloroplaste lenticulare; **cl.s.** - cloroplaste sferice; **gr.iv.** - granule intravacuolare în mişcare browniană; **n.s.** - nucleu sferic; **o.** - ostiolă; **p.c.p.** - perete celulozo-pectic; **pr.t.** - precipitate de tanin; **tn.** - tonoplast; **v.** - vacuolă (d. Savouré şi Verger-Lagadec)

E. Interpretare:

Taninurile, prezente în mod natural în vacuole în presoluţie şi tratate cu reactiv, sunt vizibile sub formă de precipitate: cafeina a pătruns deci în vacuolă traversând membranele biologice (plasmalema şi tonoplastul) care sunt bogate în lipide. Această substanţă este un alcaloid liposolubil, având în molecula sa trei radicali metil -CH_3; trebuie insistat aici asupra permeabilităţii selective a plasmalemei şi tonoplastului care lasă cafeina să intre în vacuolă, fără a denatura structurile celulare chiar dacă greutatea sa moleculară este de 194. Se poate verifica, plasmolizând şi deplasmolizând acelaşi material; montat în reactiv.

La nivel celular există o semipermeabilitate sau schimburi de apă între vacuolă şi mediul exterior; acestea sunt fenomene de osmoză (plasmoliză şi deplasmoliză). Ele constituie un

Scanned with OKEN Scanner

criteriu al vieţii celulei; bariera semipermeabilă este constituită de ansamblul plasmalemă-citoplasmă- tonoplast.

Se poate, de asemenea, pune în evidenţă o permeabilitate selectivă: anumite substanţe, pătrunzând în citoplasmă, pot denatura proteinele celulare ale hialoplasmei şi nucleoplasmei, însă nu trec în vacuolă (de ex. sulfocianura de potasiu), tonoplastul este deci o membrană vie, activă.

Alte substanţe intră până în vacuolă (de ex. acetamida, formamida, ureea şi cafeina); aceasta pune în evidenţă permeabilitatea plasmalemei şi a tonoplastului, legată fie de greutatea moleculară mică a substanţelor, fie de gradul lor de liposolubilitate (prezenţa de radicali metil - CH_3 în moleculă). Reamintim aici coloraţia vitală a vacuolei cu roşu neutru, a cărui penetrare este în legătură cu mărimea micelelor acestui reactiv şi în legătură cu cantitatea de coloizi vacuolari.

CAPITOLUL VI

INCLUZIUNILE ERGASTICE (INERTE)

Incluziunile ergastice sunt formaţiuni citoplasmatice rezultate din activitatea vitală a protoplastului.

Diversitatea incluziunilor ergastice este determinată, în mare parte, de specificitatea metabolică a fiecărui ţesut. Formaţiunile inerte pot fi produşi organici sau anorganici de rezervă, în majoritate de origine secundară, rezultaţi în urma proceselor metabolice, care reintră, cel puţin parţial, în circuitul nutritiv al plantei; mai rar sunt substanţe de excreţie, în care caz nu pot fi refolosite de plante. Ca stare de agregare sunt substanţe solide.

1. Studiul granulelor de amidon

Amidonul este o substanţă organică, de natură glucidică solidă; cu o largă răspândire în regnul vegetal. Este un polizaharid natural $(C_6H_{10}O_5)_n$ care rezultă în urma procesului de fotosinteză. După locul de depozitare poate fi: amidon **plastidial, autohton** sau de **asimilaţie** care se formează în cloroplastele celulelor din organele expuse la lumină; amidon de **migraţie** (tranzitoriu), care este transportat spre organele de depozitere şi amidon de **rezervă**, care se depune în amiloplastele din celulele seminţelor, rădăcinilor, rizomilor, tuberculilor, bulbilor. Se studiază în cele ce urmează, în detaliu, amidonul de **rezervă**.

1° În tubercului de cartof

A. Material:

- Tubercul de cartof (***Solanum tuberosum***, fam. ***Solanaceae***)

B. Protocol experimental:

Se îndepărtează periderma de la periferia tuberculului. Se secţionează, cu ajutorul unui ac spatulat, un fragment din tubercul; de pe suprafaţa acestuia se rade o mică cantitate de material din parenchimul de depozitare care se pune pe lamă într-o picătură de apă. Pentru a dispersa cât mai mult granulele se apasă uşor pe lamelă. Observaţiile se efectuează la un obiectiv puternic.

Scanned with OKEN Scanner

C. Observaţii:

Pot fi evidenţiate granule de amidon simple, compuse şi semicompuse. Granulele simple sunt acelea care iau naştere, câte unul singur, într-un amiloplast. Pot avea formă sferică sau ovală, cu hil centric, situat central, în jurul căruia se observă straturi concentrice egale de amidon, sau cu hil excentric, situat lateral, când granulul prezintă o stratificare inegală, excentrică. Granulele compuse rezultă din formarea mai multor centre iniţiale de depunere (2-3 sau mai multe hiluri) sau mai multe granule care fuzionează. În cazul granulelor semicompuse două sau mai multe granule alăturate, formate într-un amiloplast sunt înconjurate de straturi (zone) concentrice comune. Dimensiunile acestor granule sunt cuprinse între 2 şi 275 μm (Fig. 68).

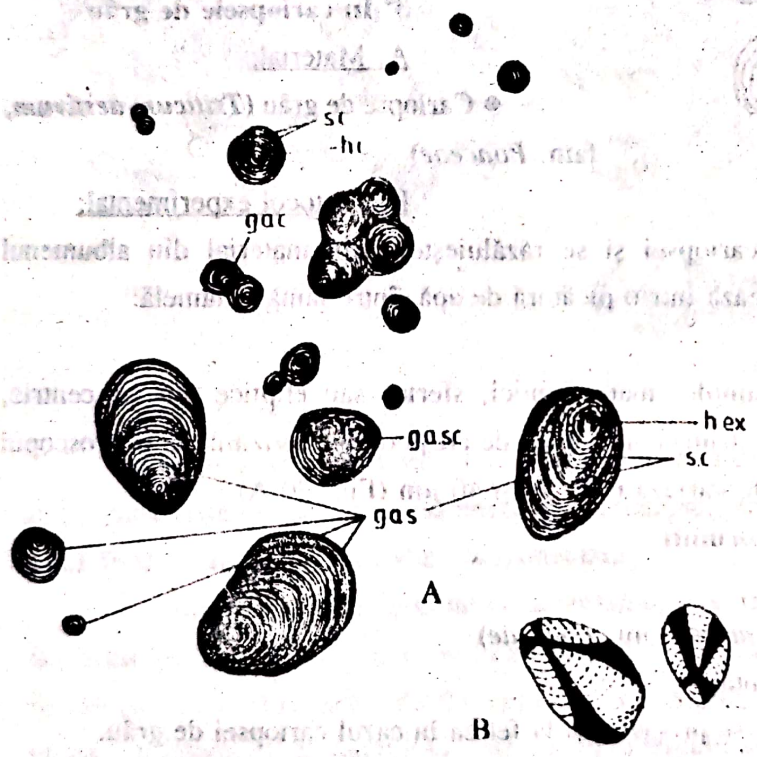


Fig. 68. Granule de amidon din celule parenchimatice ale tuberculului de cartof (*Solanum tuberosum*)(A); fenomenul "crucii negre" (B); g.a. - granule de amidon (c. - compuse, s. - simple, sc. - semicompuse), h. - hil (c. - centric, ex. - excentric); s.c. - straturi de creştere (orig.)

2° În seminţele de fasole

A. Material:

- Seminţe de fasole (*Phaseolus vulgaris*, fam. *Fabaceae*)

B. Protocol experimental:

Se îndepărtează tegumentul seminal şi se separă cele două cotiledoane; se răzăluieşte puţin material din ţesutul nutritiv al cotiledonului care se montează într-o picătură de apă, între lamă şi lamelă.

C. Observații:

Granulele de amidon sunt simple, de formă eliptică, ovală sau sferică, cu hilul centric, alungit și ramificat, în jurul căruia se disting straturi (striuri) concentrice de amidon. Dimensiunile acestor granule variază între 50 și 100 μm (Fig. 69).

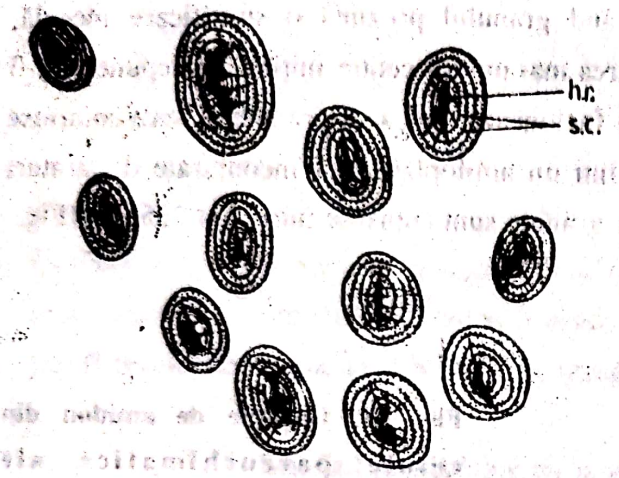


Fig. 69. Granule de amidon din celule ale cotiledoanelor embrionului semințel de fasole (*Phaseolus vulgaris*); h.r. - hil ramificat; s.c. - straturi de creștere (orig.)

3° În cariopsele de grâu

A. Material:

- Cariopse de grâu (***Triticum aestivum***, fam. ***Poaceae***)

B. Protocol experimental:

Se îndepărtează pericarpul cariopsei și se răzăluiește puțin material din albumenul amidonos, de culoare albă; se montează într-o picătură de apă, între lamă și lamelă.

C. Observații:

Granulele de amidon sunt simple, mari și mici, sferice sau eliptice, cu hil centric, punctiform sau foarte ușor alungit și striuri concentrice de creștere puțin vizibile la microscopul fotonic. Dimensiunile acestor granule variază între 30 și 40 μm (Fig. 70 A).

4° În cariopsele de porumb

A. Material:

- Cariopse de porumb (***Zea mays***, fam. *Poaceae*)

B. Protocol experimental:

Pentru obținerea preparatului se procedează la fel ca în cazul cariopsei de grâu.

C. Observații:

Granulele de amidon sunt simple, de formă poliedrică, cu hilul centric, stelat, înconjurat de striuri concentrice foarte fine. Dimensiunile acestor granule sunt cuprinse între 10 și 15 μm (Fig. 70 B).

5° În cariopsele de ovăz

A. Material:

- Cariopse de ovăz (***Avena sativa***, fam. *Poaceae*)

B. Protocol experimental:

Pentru obţinerea preparatului se procedează la fel ca în cazul cariopsei de grâu.

C. Observaţii:

Granulele de amidon sunt compuse, de formă ovală sau aproape sferică, având 300-600 μm în diametru, constituite dintr-un număr variabil de granule parţiale, în medie 150-200, cu hil centric, punctiform. Dimensiunile acestor granule sunt cuprinse între 300 şi 600 μm.

Printre granulele compuse, mari, se disting şi unele parţiale, simple, mici, fusiforme (Fig. 70 C).

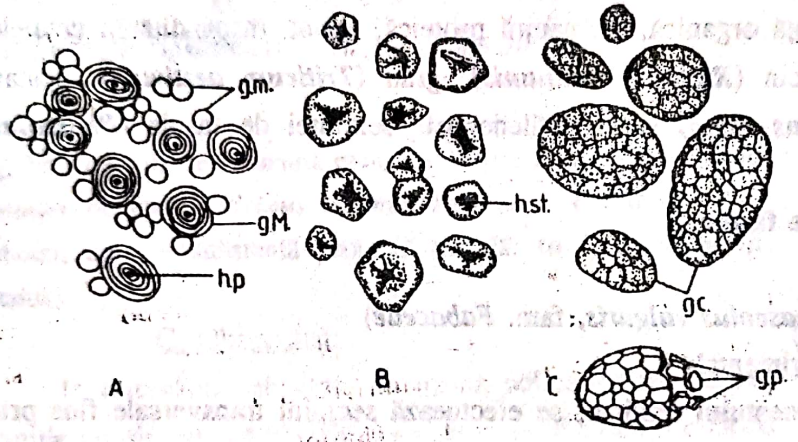


Fig. 70. Granule de amidon din celule ale albumenului cariopsei de grâu (*Triticum aestivum*) (A), porumb (*Zea mays*) (B), ovăz (*Avena sativa*) (C). g. - granule (c. - compuse, m. - mici, M. - mari, p. - parţiale); h. - hil (p. - punctiform, st. - stelat (d. Tutaiuk)

D. Interpretare:

Amidonul reprezintă cea mai răspândită şi mai importantă dintre incluziunile ergastice, atât pentru viaţa plantei, ca sursă energetică principală, cât şi din punct de vedere economic, ca sursă fundamentală pentru industria alimentară.

În ceea ce priveşte conţinutul de amidon, prezent la toate plantele fotosintetizante, la unele cantitatea este mai mare, iar la altele mai mică. Cea mai mare cantitate de amidon se află în cariopsele de ovăz (70 - 80%), apoi în cele de grâu (63 - 67%), în cele de porumb (60 - 66%), în seminţele de fasole (42 - 43%), în tuberculii de cartof (13 - 25%).

Amidonul este în general structurat; el este format din 20-30% amiloză şi 70-80% amilopectină.

Amidonul de rezervă se formează în amiloplaste şi se prezintă sub formă de granule. Granula de amidon se formează prin depunerea în jurul unui punct de origine, numit hil, cu localizare centrală (centric) sau laterală (excentric) a unor straturi (striuri) succesive de amidon, mai mult sau mai puţin concentrice, alternând unele deschise la culoare, cu altele întunecate.

Observarea granulelor de amidon în lumină polarizată relevă o netă birefringenţă. Fenomenul "crucii negre", evidenţiat la microscopul polarizant, demonstrează structura microcristalină a granulelor de amidon, o dispoziţie moleculară de tip cristalin, în care axa lanţurilor polizaharidice este orientată radiar. Locul de întretăiere a braţelor crucii negre indică poziţia hilului; când hilul este centric, braţele crucii negre sunt egale, iar când hilul este excentric crucea neagră prezintă braţele inegale (Fig. 68 B).

2. Studiul granulelor de aleuronă

Aleurona este o substanţă organică, de natură proteică, solidă răspândită în celulele albumenului seminţelor de: ricin (***Ricinus communis***), grâu (***Triticum aestivum***), bostan (***Cucurbita pepo***), nuc (***Juglans regia***) şi în cotiledoanele seminţei de fasole (***Phaseolus vulgaris***).

1°În seminţele de fasole

A. Material:

- Seminţe de fasole (***Phaseolus vulgaris***, fam. *Fabaceae*)

B. Protocol experimental:

După îndepărtarea tegumentului seminal, se efectuează secţiuni transversale fine prin ţesutul nutritiv al cotiledonului, care se colorează cu iod în iodură de potasiu şi se montează în reactiv, între lamă şi lamelă.

C. Observaţii:

Se observă numeroase celule mici, poliedrice, cu pereţii celulozici, subţiri. În interiorul fiecărei celule se disting granule de aleuronă simple, sferice, mici, colorate în galben, ca şi masa proteică fundametală. Printre aceste granule mici se observă, din loc în loc, granule mari de amidon, colorate în albastru, sub influenţa reactivului cu care este tratată secţiunea (Fig. 71).

2°În seminţele de ricin

A. Material:

- Seminţe mature de ricin (***Ricinus communis***, fam. *Euphorbiaceae*).

B. Protocol experimental:

După îndepărtarea tegumentului seminal, se efectuează secţiuni transversale fine prin ţesutul de depozitare (endosperm secundar sau albumen), care se montează într-o picătură de apă, între lamă şi lamelă.

Scanned with OKEN Scanner

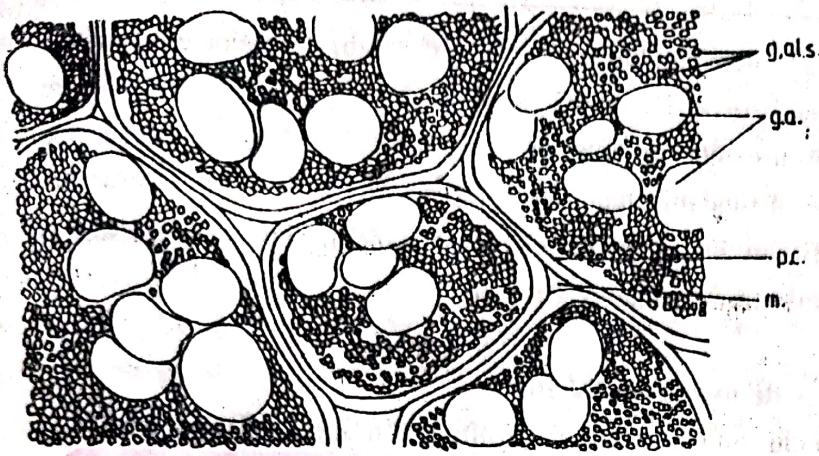


Fig. 71. Granule de aleuronă simple în celule ale cotiledoanelor embrionului semințel de fasole (*Phaseolus vulgaris*), secțiune transversală: g.a. - granule de amidon; g.al.s. - granule de aleuronă simple; m. - meat; p.c. - perete celular (d. Centova)

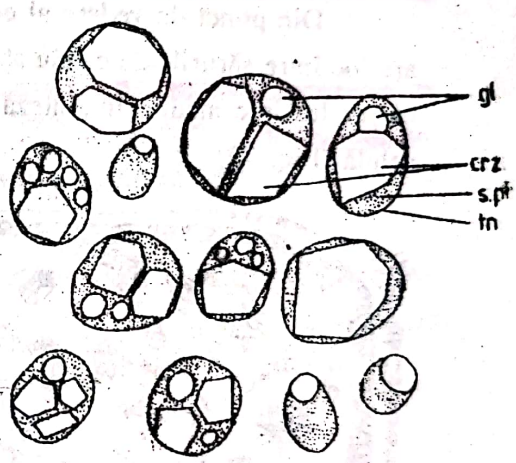


Fig. 72. Granule de aleuronă compuse din celule ale albumenului semințel de ricin (*Ricinus communis*); crz. - cristaloizi; gl. - globoizi; s.pr. - substanță proteică amorfă; tn. - tonoplast (d. Tutaiuk)

C. Observații:

În interiorul celulelor, de formă poliedrică se observă granule de aleuronă compuse, ovoidale, cu diametrul cuprins între 20 și 40 μm. În masa fundamentală amorfă a granulului se distinge un corpuscul sferic și puțin refringent, numit *globoid*, care din punct de vedere chimic este un inozitofosfat de calciu și magneziu, numit *fitină*, și o formațiune poliedrică refringentă, în formă de cristal, numit *cristaloid*, de natură proteică, ocupând o mare parte din volumul granulului de aleuronă. Uneori, pe lângă aceste două formațiuni se mai pot observa unul sau câteva cristale de oxalat de calciu sau picături de ulei (Fig. 72).

D. Interpretare:

Aleurona apare sub formă de granule, de mărimi variate și în număr mare în celulele albumenului semințelor mature. Ea se formează în vacuole, prin deshidratarea și fragmentarea acestora, care conțin proteine dizolvate.

În timpul coacerii semințelor, sucul celular devine din ce în ce mai dens, datorită unei deshidratări puternice și progresive. Aceasta are ca urmare fragmentarea vacuolei unice în mai multe vacuole mici, devenind fiecare câte un granul de aleuronă.

Scanned with OKEN Scanner

La germinarea seminţelor, granulele de aleuronă se îmbibă cu apă, proteinele depozitate sub formă de substanţă de rezervă se dizolvă şi vacuolele se refac din nou. Din punct de vedere structural, un granul de aleuronă prezintă la exterior o membrană subţire, proteică, ce delimitează la interior o masă proteică fundamentală.

Granulele de aleuronă pot fi simple, ca în celulele cotiledoanelor seminţei de fasole şi compuse, ca în celulele albumenului seminţei mature de ricin.

3. Studiul cristalelor de oxalat de calciu

Cristalele de oxalat de calciu sunt formaţiuni rezultate din metabolismul celulei şi prezente de obicei în vacuole, la majoritatea plantelor.

Din punct de vedere al genezei, cristalele de oxalat de calciu iau naştere din reacţia ce are loc între sărurile de calciu absorbite din mediul înconjurător şi acidul oxalic ce se formează ca produs intermediar în sinteza proteinelor, cât şi din alte procese metabolice care au loc în celulă (Fig. 73).

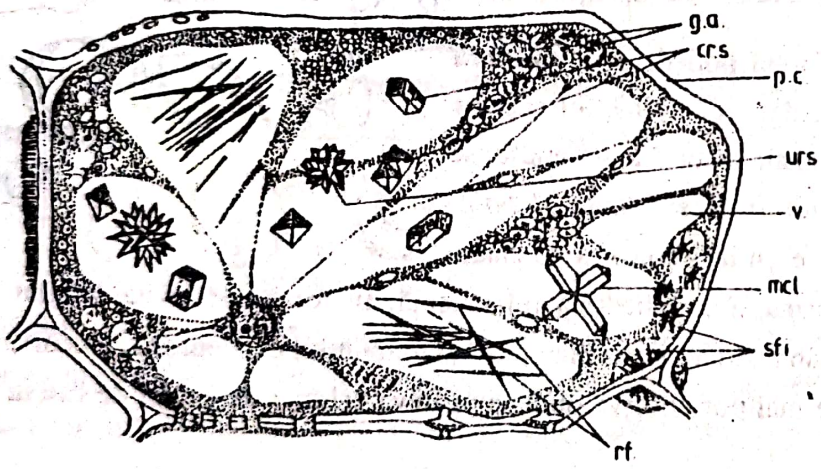


Fig. 73. Incluziunile inerte ale celulei vegetale, secţiune transversală; **cr.s.** - cristale simple; **g.a.** - granule de amidon; **mcl.** - maclă; **p.c.** - perete celular; **rf.** - rafide; **sf.i.** - sferocristale de inulină; **v.** - vacuolă; **urs.** - ursin (d. Atabekova şi Ustinova)

Se evidenţiază câteva tipuri şi forme de cristale de oxalat de calciu, după cum urmează: cristale simple şi macle în scvamele de ceapă (*Allium cepa*) şi de usturoi (Fig. 54), ursini sau druze în ramura de tei, rafide în frunza de Aloë.

1°În scvamele de ceapă şi usturoi

A. Material:

- Tunici externe, uscate, solzoase (scvame sau catafile) ale bulbului de ceapă (*Allium cepa*, fam. *Liliaceae*) şi de usturoi (*Allium sativum*, fam. *Liliaceae*).

Scanned with OKEN Scanner

B. Protocol experimental:

Pentru realizarea preparatului se fierb câteva frunze, timp de 10-15 minute, pentru a îndepărta aerul din cavitatea celulei, după care se introduc într-o soluţie de glicerină apoasă. Se realizează, apoi, preparate permanente.

C. Observaţii:

Analizând la microscop un fragment din frunză, în interiorul celulelor de formă poliedrică, apar prin transparenţă, fie **cristale simple** prismatice, fie cristale simple (2-3) care se întrepătrund formând **macle**. Aceleaşi tipuri de cristale se pot întâlni în celulele solzilor bulbului de crin (***Lilium candidum***) şi ale bulbului de zambilă (***Hyacinthus sp.***) (Fig. 54).

2⁰În tulpina de tei

A. Material:

- Ramură de tei (***Tilia sp.***, fam. ***Tiliaceae***)

B. Protocol experimental:

Se analizează preparate permanente cu secţiuni transversale prin ramură.

C. Observaţii:

În celulele parenchimurilor cortical şi medular se observă **ursini** sau **druze**, cu aspect globulos-ţepos, datorită concreşterii unui număr de cristale, având vârfurile ascuţite spre exteriorul formaţiunii (Fig. 55B).

3⁰În frunza de Aloë sp.

A. Material:

- Frunze de ***Aloë arborescens,*** fam. ***Liliaceae***

B. Protocol experimental:

Se analizează preparate permanente, cu secţiuni longitudinale prin frunză.

C. Observaţii:

În ţesutul asimilator al frunzei, din loc în loc, pot fi observate celule poligonal-ovale sau fusiforme, mult mai mari faţă de celulele obişnuite ale mezofilului. În aceste celule se observă fascicule de cristale aciculare, cu capetele ascuţite, numite **rafide**. Rafidele sunt dispuse adesea într-o vacuolă mare, fiind învelite într-o substanţă mucilaginoasă (Fig. 56).

D. Interpretare:

Oxalatul de calciu are totdeauna formă cristalină, acesta cristalizând fie în sistemul **monoclinic**, sub formă de monohidrat de oxalat de calciu, cu aspect de cristale mai mult sau mai

Scanned with OKEN Scanner

puţin izodiametrice, fie în sistemul tetragonal, sub formă de trihidrat de oxalat de calciu, cu aspect de cristale de formă prismatică sau piramidală (bipiramidală). Cristalele pot fi solitare în celule sau se pot grupa formând macle, prin întrepătrunderea a două-trei cristale simple şi druze (ursini) prin alipirea sau întrepătrunderea mai multor cristale simple.

Uneori, aceste cristale sunt atât de mici, încât nu se poate distinge sistemul de cristalizare căruia îi aparţin. În acest caz cristalele se prezintă sub formă de "nisip" de oxalat de calciu (de ex. în celulele frunzelor de mătrăgună - ***Atropa belladona*** şi ciumăfaie - ***Datura stramonium***, ambele specii din fam. *Solanaceae*.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL VII

PERETELE CELULAR

Majoritatea celulelor vegetale sunt înconjurate de un perete scheletic celulozo-pectic produs al activităţii protoplastului, care le imprimă o formă specifică şi în acelaşi timp le protejează de mediul înconjurător.

Peretele celular este un constituent caracteristic tuturor celulelor plantelor superioare şi majorităţii celor inferioare; este deci unul dintre elementele structurale specifice celulei vegetale, având o cu totul altă natură chimică decât protoplastul, spre deosebire de celulele animale, la care compoziţia chimică a membranei celulare este apropiată de cea a citoplasmei.

Pereţii celulelor vegetale sunt formaţi din **celuloză**, alături de **substanţe pectice, hemiceluloze, caloză, chitină**, în proporţii ce variază de la o specie la alta.

1. Studiul celulozei peretelui celular

A. Material:

- Fruct (capsulă) de bumbac (***Gossypium hirsutum***, fam. ***Malvaceae***)

B. Reactivi:

Clorură de zinc iodată (ZnCII)

C. Protocol experimental:

Se desprind câţiva peri seminali dintr-o capsulă şi se observă la microscop pe lama uscată.

D. Observaţii

Aceşti peri se prezintă ca celule cu diametrul longitudinal foarte mare faţă de cel transversal. Celulele prezintă un lumen foarte îngust şi pereţi îngroşaţi, conţinând peste 95% celuloză pură (Fig. 74).

Pentru a pune în evidenţă natura chimică a pereţilor se tratează perii seminali cu clorură de zinc iodată (ZnCII), un reactiv specific celulozei. Celuloza se transformă în hidrocelulază, umflându-se mult şi colorându-se în albastru.

E. Interpretare:

Celuloza este principalul constituent al peretelui celulei vegetale, relativ constant şi aproape întotdeauna asociat cu hemicelulozele. Celuloza este un polizaharid provenit din

Scanned with OKEN Scanner

condensarea a "n" molecule de glucoză, cu eliminare de apă $(C_6H_{10}O_5)_n$. Reprezintă un coloid cristalizat, insolubil în apă şi în cea mai mare parte a solvenţilor organici neutri şi alcalini, însă solubilă în reactivul Schweitzer (soluţie amoniacală de hidroxid de cupru). Acizii şi clorurile metalelor grele transformă celuloza într-o substanţă mai puţin polimerizată numită **hidroceluloză**, care se colorează cu soluţia Lugol (I_2 în KI) în albastru.

Fig. 74. Peri de pe sămânţa de bumbac (*Gossypium hirsutum*), observaţi de faţă: **l.** - lumen; **p.b.** - parte bazală de inserţie; **p.clz.** - perete celulozic (d. Troll)

2. Studiul punctuaţiilor şi plasmodesmelor

Punctuaţiile sunt porţiuni neîngroşate în peretele celular, care au rolul de a înlesni diferite schimburi de la o celulă la alta.

În general, punctuaţiile prezintă două cavităţi (canale) care iau naştere în pereţii celulelor învecinate şi corespund ca poziţie, fiind separate numai prin lamela mediană şi pereţii primari ai ambelor celule. De regulă, prin punctuaţii se stabileşte legătura între protoplaştii a două celule vecine.

1° Punctuaţiile simple

A. Material:

- Ramură de curpen de pădure (***Clematis vitalba***, fam. *Ranunculaceae*)

B. Protocol experimental:

Se utilizează preparate permanente cu secţiuni transversale şi longitudinale prin ramură.

C. Observaţii:

Se evidenţiază punctuaţii simple în pereţii celulelor parenchimului medular şi cortical, distingându-se peretele, cavitatea (canalul) şi deschiderea punctuaţiei (Fig. 75).

D. Interpretare:

Punctuaţiile simple sunt caracteristice celulelor din parenchimul medular şi cortical. La organizarea unei punctuaţii simple, participă diferite straturi ale peretelui. "Fundul" (membrana obturantă) punctuaţiei este căptuşit de pereţii primari, între care se află lamela mediană. Părţile

Scanned with OKEN Scanner

laterale ale punctuației și deschiderea sunt delimitate (căptușite) de peretele secundar.

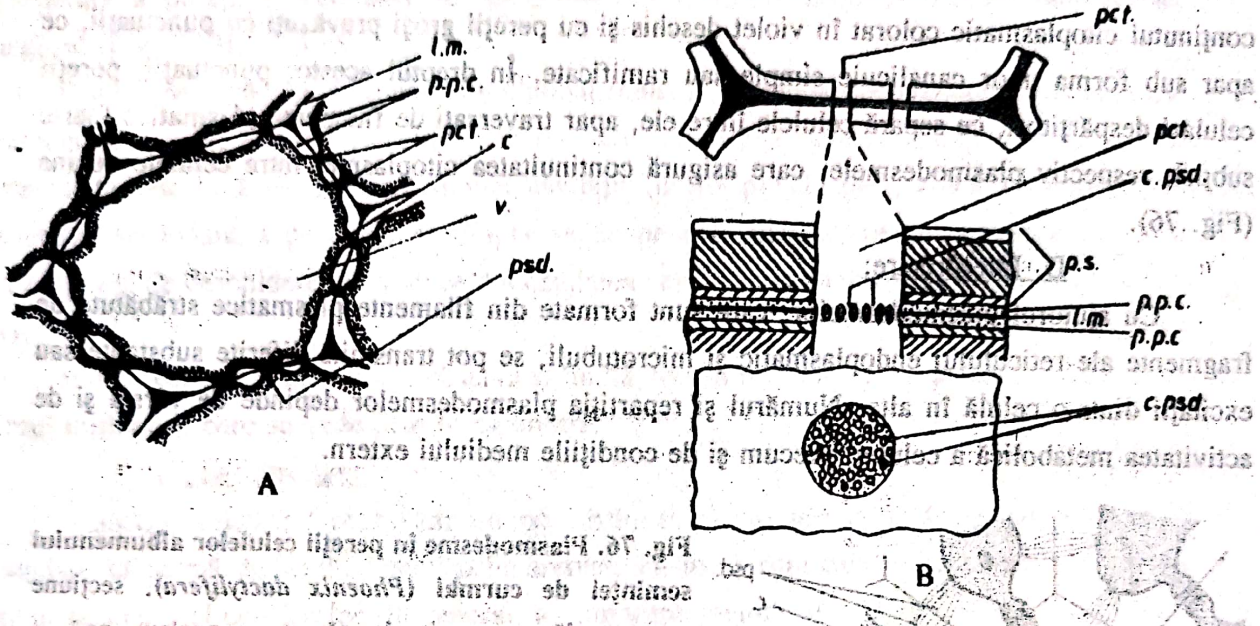


Fig. 75. Punctuații simple în pereții celulelor de parenchim cortical și medular din tulpina de curpen de pădure (*Clematis vitalba*), secțiune transversală: ansamblu (A), detalii (B); c. - citoplasmă; c.psd. - canalicule plasmodesme; l.m. - lamelă mediană; pct. - punctuații; psd. - plasmodesme; p.s. - perete secundar; p.p.c. - pereți primari pecto-celulozici; v. - vacuolă (d. A - Buvat; B - Atabekova și Ustinova)

2° Plasmodesmele

Plasmodesmele sunt punți citoplasmatice intercelulare, delimitate de plasmalemă, care realizează unitatea structurală și funcțională a celulelor în cadrul unui țesut.

A. Material:

- Semințe de curmal (*Phoenix dactylifera*, fam. *Palmae*)

B. Protocol experimental:

Pentru a efectua secțiuni foarte fine, semințele se țin în prealabil, câteva ore în apă distilată. Secțiunile obținute se tratează, într-o sticlă de ceas, mai întâi cu lugol concentrat, timp de o oră și jumătate, după care se adaugă câteva picături de acid sulfuric 25 %, timp de 12 - 15 ore. Se elimină acidul sulfuric prin spălare cu apă distilată și apoi se trece la colorarea cu violet de gențiană, timp de 10 minute. Secțiunile se spală din nou, până la eliminarea totală a

colorantului şi numai după aceea se montează în glicero-gelatină.

C. Observaţii:

La obiectivul cu imersie, în câmpul microscopului se observă numeroase celule cu conţinutul citoplasmatic colorat în violet deschis şi cu pereţii groşi prevăzuţi cu punctuaţii, ce apar sub forma unor canalicule simple sau ramificate. În dreptul acestor punctuaţii, pereţii celulari despărţitori, ce separă celulele între ele, apar traversaţi de filamente plasmatice foarte subţiri, respectiv plasmodesmele, care asigură continuitatea citoplasmei între celulele vecine (Fig. 76).

D. Interpretare:

Cu ajutorul plasmodesmelor, care sunt formate din filamente plasmatice străbătute de fragmente ale reticulului endoplasmatic şi microtubuli, se pot transmite diferite substanţe sau excitaţii dintr-o celulă în alta. Numărul şi repartiţia plasmodesmelor depinde de vârsta şi de activitatea metabolică a celulei, precum şi de condiţiile mediului extern.

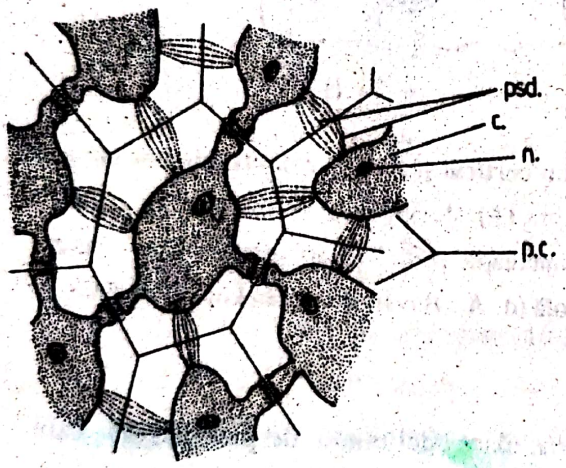


Fig. 76. Plasmodesme în pereţii celulelor albumenului seminţei de curmal (*Phoenix dactylifera*), secţiune transversală; **c.** - citoplasmă; **n.** - nucleu; **psd.** - plasmodesme; **p.c.** - perete celular (d. Strasburger)

3° Punctuaţiile areolate

A. Material:

- Fragment din tulpina de pin (***Pinus sylvestris***, fam. *Pinaceae*.)

B. Protocol experimental:

Se utilizează preparate permanente cu secţiuni transversale, longitudinal-radiare şi longitudinal-tangenţiale prin tulpina cu structură secundară (Fig. 77 A)

C. Observaţii:

În secţiunile transversală şi longitudinal-tangenţială, o punctuaţie areolată apare sub forma a două bifurcaţii îndreptate una spre cealaltă. Cavitatea punctuaţiei are forma unui trunchi de con, cu baza mare spre peretele primar. Peretele secundar dă impresia că se dezlipeşte de peretele primar şi prin marginile lui se apropie de deschiderea punctuaţiei. Peretele primar, subţire, care căptuşeşte "fundul" punctuaţiei areolate este prevăzut cu o îngroşare, având aspect

Scanned with OKEN Scanner

de disc, care se numeşte **torus.** Partea din peretele primar care rămâne permeabilă, de o parte şi de alta a torusului, se numeşte **margo.** Lamela mediană şi peretele primar prezintă la locul de separare a pereţilor secundari de cei primari, câte o proeminenţă inelară, numită **inel marginal** (Fig. 77 B, C, E-b)

Privite de faţă (în secţiune longitudinal-radiară), punctuaţiile areolate apar ca nişte deschideri circulare, eliptice sau ovale. Areola care se observă când punctuaţia este privită de la suprafaţă este dată de conturul limitei cavităţii (limita punctuaţiei), adică a locului unde îngroşarea secundară a peretelui se desprinde de peretele primar, pentru a forma cavitatea punctuaţiei şi de deschiderea care duce din cavitatea celulei în cavitatea punctuaţiei (Fig. 77 D, E-a).

Într-o secţiune fină se poate observa şi limita torusului, reprezentat prin al treilea contur (cercul mijlociu), care se vede prin transparenţă.

D. Interpretare:

Punctuaţia areolată reprezintă un loc subţire în perete deasupra căruia stau îngroşările secundare în formă de boltă. Punctuaţiile areolate cu torus sunt caracteristice traheidelor din lemnul secundar al coniferelor (în general, al gimnospermelor). Punctuaţii areolate, dar torus, se găsesc şi în pereţii vaselor conducătoare din lemnul secundar al dicotiledonatelor.

3. Îngroşările peretelui celulozo-pectic

Odată cu creşterea celulei, creşte şi peretele acesteia, până când celula atinge dimensiunile caracteristice pentru ţesutul respectiv al plantei. Creşterea peretelui celular se realizează atât în suprafaţă, cât şi în grosime. Creşterea în grosime, care priveşte atât peretele primar cât mai ales peretele secundar, are loc prin apoziţie, adică prin adăugare spre interior, mai rar spre exterior, de noi lamele microfibrilare, imprimând peretelui un aspect lamelar concentric.

1° Îngroşările centrifugale

Se pot produce uniform sau se prezintă sub formă de ornamentaţii sculpturale (cazul cel mai frecvent) datorită îngroşării neuniforme a exinei pereţilor granulelor de polen.

A. Material:

- Granule de polen de nalbă (*Malva sylvestris*, fam. *Malvaceaea*) şi de floarea soarelui (*Helianthus annuus*, fam. *Asteraceae*).

Scanned with OKEN Scanner

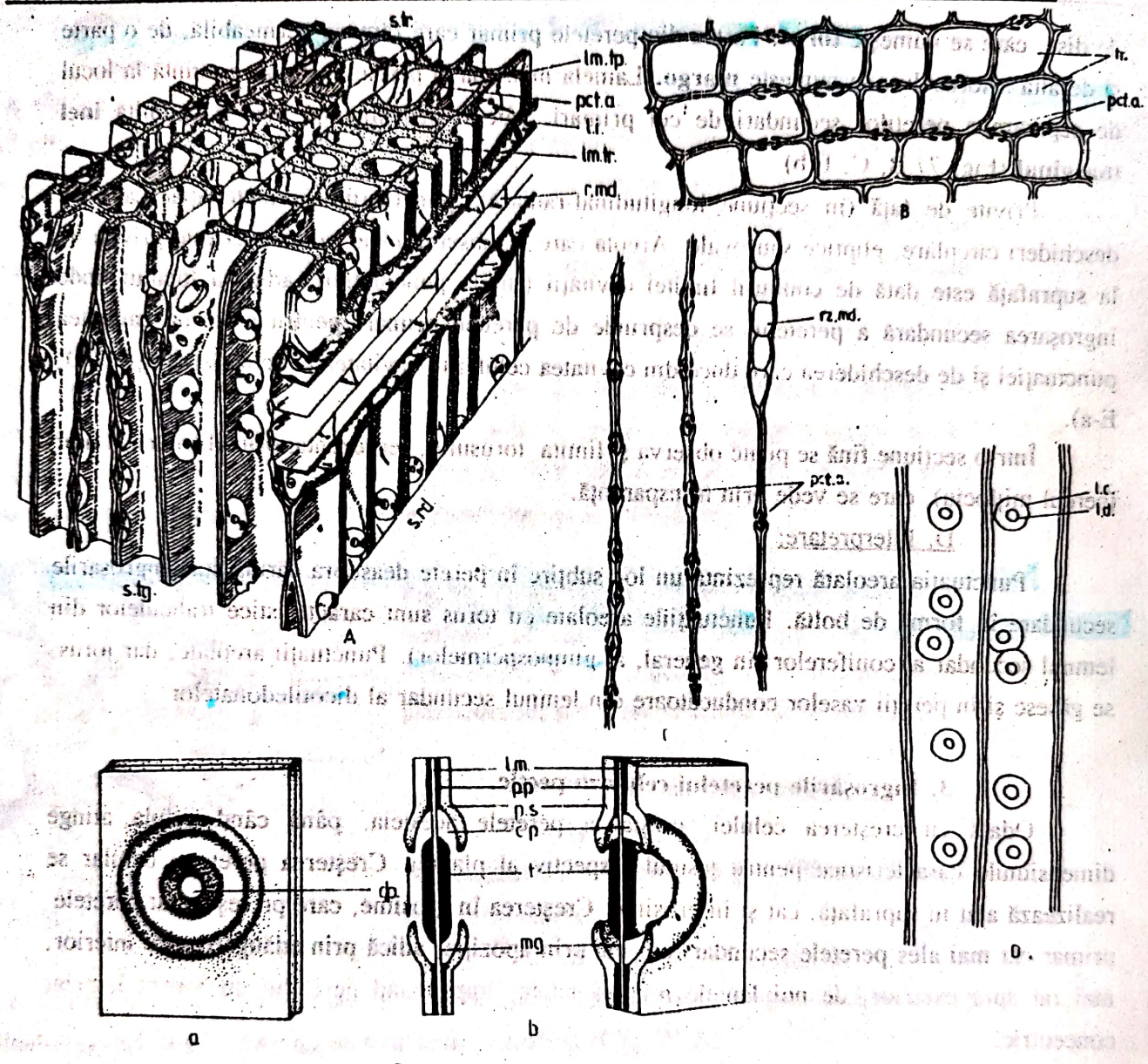


Fig. 77. Fragment din lemnul secundar al tulpinii de pin (*Pinus sylvestris*): aspect tridimensional (A); traheide cu punctuaţii areolate, secţiuni: transversală (B), tangenţială (C), radiară (D); structura unei punctuaţii areolate (E: văzută de faţă - a, văzută din profil - b); c.p. - cavitatea punctuaţiei; d.p. - deschiderea punctuaţiei; l.c. - limita cavităţii, l.d. - limita deschiderii; l.i. - limita inelului anual; lm. - lamela mediană; lm.tp. lemn timpuriu; lm.tr. - lemn târziu; mg. - margo; p.p. - perete primar; p.s. - perete secundar; pct.a. - punctuaţie areolată; r.md. rază medulară; s. - secţiune (r. - radiară, tg. - tangenţială, tr. - transversală); t. - torus; tr. - traheide (d. A-Nultsch; B-D-orig.; E - Filipescu şi Moţiu)

Scanned with OKEN Scanner

B. Protocol experimental

Se utilizează preparate permanente cu granule de polen de la cele două specii.

C. Observații:

Pe suprafața sporodermei se observă spini și ornamente de forme și mărimi foarte diferite, cu mare valoare taxonomică (Fig. 78).

D. Interpretare:

Îngroșările centrifugale se produc totdeauna spre exterior (la fața externă a pereților celulari), de aceea nu pot să apară la celulele grupate în țesuturi. Sunt prezente la celulele care vin în contact cu mediul ambiant, ca de exemplu la celulele libere (spori, grăuncioare de polen), ce iau naștere într-o masă nutritivă citoplasmatică.

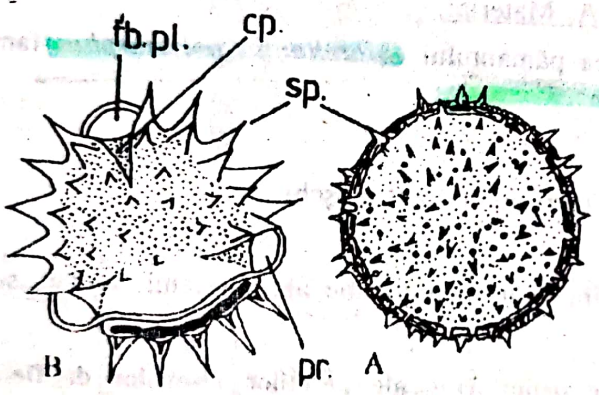


Fig. 78. Îngroșări centrifugale neuniforme ale exinei granulelor de polen de nalbă (*Malva silvestris*) (A), floarea soarelui (*Helianthus annuus*) (B), observate de față; **cp.** - colpi; **pr.** - por; **sp.** - spini; **tb.pl.** - tub polinic (d. Tarnavschi și colab.)

2° Îngroșările centripetale

Creșterea centripetală în grosime a peretelui secundar se poate produce: **uniform,** pe toată suprafața pereților (cu excepția punctuațiilor) sau **neuniform,** când are loc în anumite porțiuni ale peretelui celular.

Îngroșările centripetale neuniforme

a) la celulele endodermei de tip terțiar

A. Material:

- Rădăcini (adventive) de stânjenel (*Iris germanica*, fam. *Iridaceae*)

B. Protocol experimental:

Se utilizează preparate permanente cu secțiuni transversale prin rădăcina adultă, colorate cu verde-iod și carmin-alaunat.

C. Observații

Se observă îngroșările centripetale ale pereților celulari la nivelul endodermei. Pereții radiari și cei tangențiali interni de la majoritatea celulelor endodermei sunt îngroșați și lignificați,

Scanned with OKEN Scanner

iar pereţii tangenţiali externi, situaţi spre scoarţă, rămân neîngroşaţi şi celulozici. Datorită acestui mod de îngroşare neuniformă a pereţilor, celulele endodermei, au aspect de potcoavă în secţiune transversală (Fig. 79).

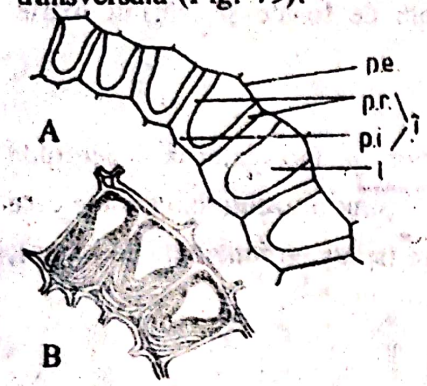


Fig. 79. Îngroşări centripetale neuniforme ale pereţilor celulelor din endoderma rădăcinii de stânjenel (*Iris germanica*), secţiune transversală: schemă (A), detaliu (B); î. - îngroşări; l. - lumen; p. - pereţi celulari; (e. - extern; i. - intern; r. - radiari) (orig.)

b) la rizoizii de la muşchi

A. Material:

- Rizoizi de la muşchiul hepatic fierea pământului (*Marchantia polymorpha*, fam. *Marchantiaceae*)

B. Protocol experimental:

Se utilizează preparate permanente cu rizoizi de la acest muşchi.

C. Observaţii:

Celulele ce formează rizoizii prezintă îngroşări neuniforme ale peretelui celular, sub formă de ornamentaţii (Fig. 80).

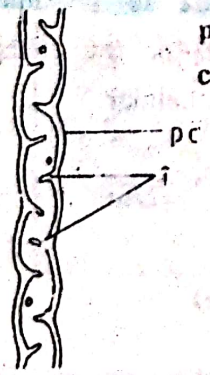


Fig. 80. Îngroşări centripetale neuniforme ale pereţilor rizoizilor de fierea pământului (*Marchantia polymorpha*), observaţi de faţă; î - îngroşări; p.c. - perete celular (orig.)

c) la vasele conducătoare lemnoase

A. Material:

- Tulpină de bostan (*Cucurbita pepo*, fam. *Cucurbitaceae*)

B. Protocol experimental:

Se utilizează preparate permanente conţinând secţiuni longitudinale prin tulpină, efectuate la nivelul unui fascicul conducător.

C. Observaţii:

Pereţii vaselor conducătoare lemnoase prezintă îngroşări centripetale neuniforme cu aspect de inele (vas inelat), de spirală (vas spiralat) sau de reţea ale cărei ochiuri reprezintă porţiuni neîngroşate ale peretelui (vas reticulat) (Fig. 81).

Scanned with OKEN Scanner

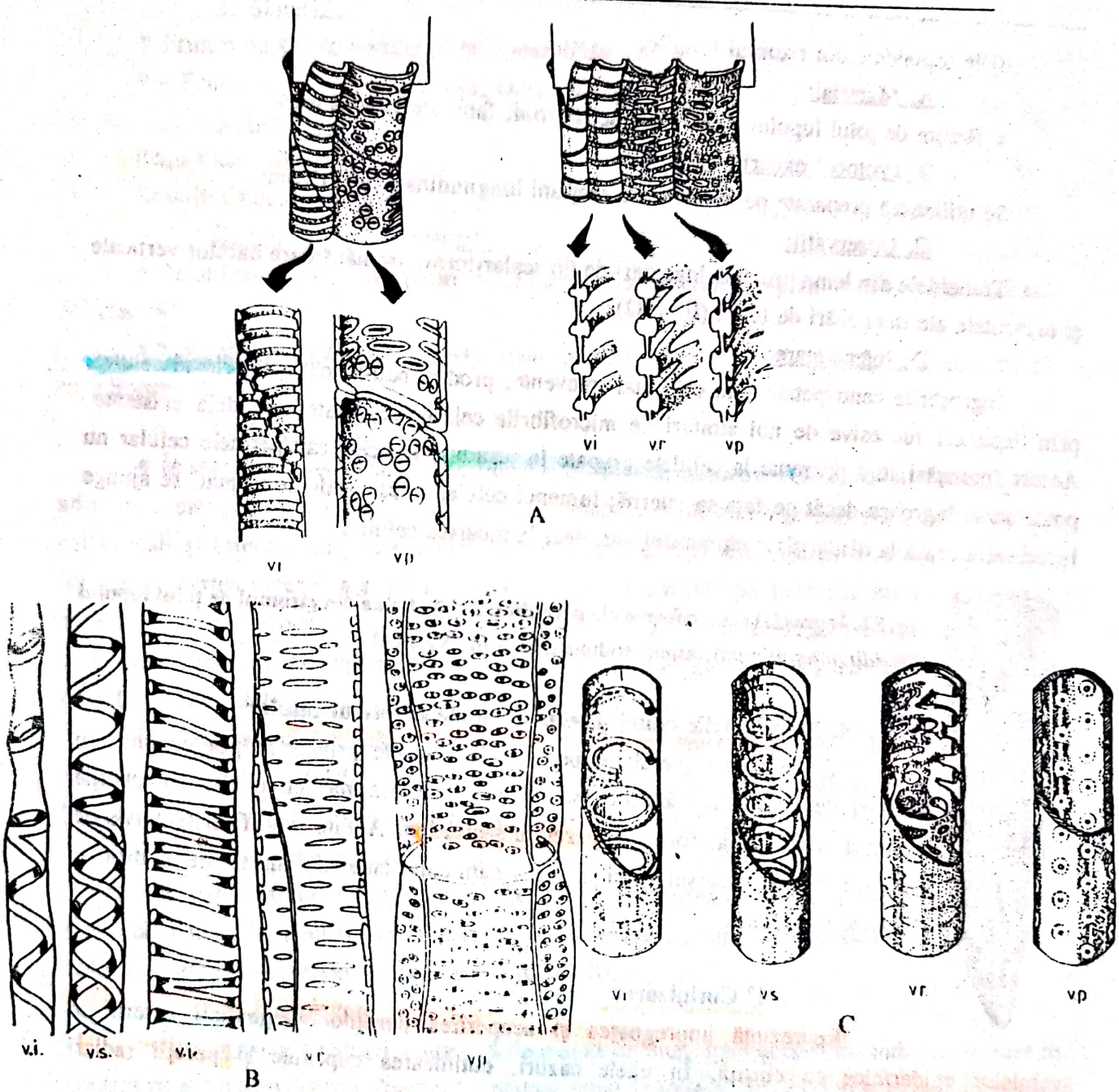


Fig. 81. Diferite tipuri de îngroşări ale pereţilor vaselor de lemn din tulpina de bostan (*Cucurbita pepo*); secţiuni longitudinale (A, B), aspect tridimensional (C); v. - vase (i. - inelate, p. - punctate, r. - reticulate, s. - spiralate) (d. A - Braune, B - Trankovski, C - Nultsch).

Scanned with OKEN Scanner

d) la traheidele din rizomul ferigilor

A. Material:

- Rizom de ţolul lupului (*Pteridium aquilinum*, fam. *Polypodiaceae*)

B. Protocol experimental:

Se utilizează preparate permanente cu secţiuni longitudinale prin rizom.

C. Observaţii:

Traheidele din lemn prezintă îngroşări de tip scalariform, asemănătoare barelor verticale şi orizontale ale unei scări de lemn (Fig. 82).

D. Interpretare:

Îngroşările centripetale sunt cele mai frecvente, producându-se către interiorul celulei, prin depuneri succesive de noi straturi de microfibrile celulozice, peste cele deja existente. Aceste îngroşări sunt prezente la celulele grupate în ţesuturi; în acest caz peretele celular nu poate să se îngroaşe decât pe faţa sa internă; lumenul celular micşorându-se treptat, se ajunge în cele din urmă la dispariţia conţinutului viu, deci la moartea celulei.

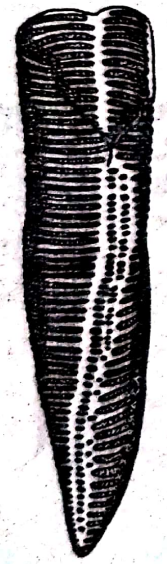


Fig. 82. Îngroşări scalariforme ale pereţilor unei traheide din rizomul de ţolul lupului (*Pteridium aquilinum*), aspect tridimensional (d. Nultsch)

4. Modificările chimice secundare ale peretelui celular

La majoritatea celulelor peste şi în peretele primar se pot depune noi straturi de substanţe scheletice secretate de citoplasmă, cu o altă compoziţie chimică şi structură, formând **peretele secundar**. Aceste modificări suferite de peretele celular în cursul vieţii celulelor sunt cunoscute sub numele de modificări chimice secundare.

1° Cutinizarea

Reprezintă impregnarea şi acoperirea pereţilor tangenţiali externi ai celulelor epidermice cu **cutină**. În unele cazuri, cutinizarea cuprinde şi pereţii radiari (anticlinali).

Procesul de depunere a cutinei în exces, sub forma unei pături continue, pe suprafaţa epidermei se numeşte **cuticularizare**. Pătura de cutină rezultată în urma cuticularizării peretelui, care acoperă epiderma şi formaţiunile sale, reprezintă **cuticula**.

Scanned with OKEN Scanner

A. Material:

● Frunze de *Clivia nobilis*, fam. *Amaryllidaceae*

●● Frunze de *Aloë arborescens*, fam. *Liliaceae*

B. Reactivi:

Roşu sudan III

Reactiv Chodat (genovez)

C. Protocol experimental:

● Se utilizează preparate permanente cu secţiuni transversale prin frunză, colorate cu cei doi reactivi.

●● Se utilizează preparate permanente cu secţiuni transversale prin frunză, colorate cu roşu Sudan III.

D. Observaţii:

● În secţiune transversală, epiderma frunzei este alcătuită din celule izodiametrice, strâns unite între ele; pereţii externi ai celulelor apar bombaţi, mult mai îngroşaţi şi cutinizaţi faţă de cei laterali şi interni, care sunt subţiri (drepţi sau ondulaţi). În general, straturile cutinizate formează partea externă a pereţilor celulari şi ele se sprijină pe straturile mijlocii şi interne celulozice şi celulozo-pectice. De cele mai multe ori şi pereţii celulozici radiari ai celulelor epidermice apar parţial impregnaţi cu cutină, aceasta ajungând uneori până la lamela mijlocie ce delimitează celulele epidermice de cele sub epidermice.

În cazul secţiunilor colorate cu roşu Sudan III, cuticula se colorează în roşu, iar pereţii externi, celulozici ai celulelor epidermice, în roz. Reactivul Chodat (genovez) colorează cuticula în galben, iar pereţii externi ai celulelor epidermice în roz (Fig. 83 A).

●● Cuticula care acoperă celulele epidermice la exterior este groasă, fin stratificată şi colorată în roşu. Stratul cutinizat cuprinde uneori şi o parte din pereţii radiari ai celulelor, prezentând nişte intrânduri conice (prelungiri cuneiforme, îngroşări denticulare) între pereţii radiari (laterali) ai celulelor epidermice (Fig. 83 B).

E. Interpretare:

● În compoziţia cutinei, substanţă de natură lipidică, intră acizi graşi hidroxilaţi, care în contact cu aerul se oxidează, formând o pătură impermeabilă pentru gaze şi apă, care impiedică pierderea acesteia din urmă prin evaporare, în timpul perioadelor cu temperaturi ridicate, prin moderarea (limitarea) procesului de traspiraţie.

●● Cuticula acoperă epiderma ca un strat continuu, întrerupt numai în dreptul deschiderii

Scanned with OKEN Scanner

(ostiolei) stomatelor. Cuticula groasă prezintă o stratificare fină, caracteristică. Cutinizarea şi cuticularizarea peretelui celular se pot observa în secţiuni transversale efectuate prin organele vegetative aeriene.

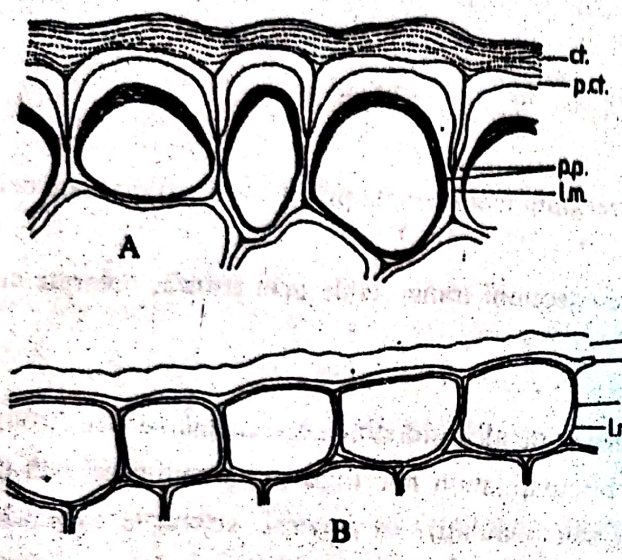


Fig. 83. Cutinizarea şi cuticularizarea pereţilor externi ai celulelor epidermice din frunza de *Clivia nobilis* (A), *Aloë arborescens* (B), secţiuni transversale; ct. - cuticulă; l.m. - lamelă mediană; p.p. - pereţi primari; p.ct. - perete cutinizat (d. orig.)

2° Cerificarea

Constă în impregnarea şi acoperirea pereţilor celulelor epidermice cu ceară. Cerificarea afectează pereţii externi cutinizaţi iar excesul de ceară se depune pe suprafaţa epidermei sub forme diferite: rotundă, elipsoidală, în plăci, sub formă de particule simple, grămezi neregulate sau bastonaşe perpendiculare ce acoperă celulele epidermice ale unor fructe, frunze sau tulpini.

A. Material:

- Frunze de brad (*Abies alba*, fam. *Pinaceae*)
- ●● Frunze de salcie (*Salix alba*, fam. *Salicaceae*)
- ●●● Tulpini de trestie de zahăr (*Saccharum officinarum*, fam. *Poaceae*)

B. Protocol experimental:

- Se analizează macroscopic faţa inferioară a frunzelor.
- ●● Se efectuează secţiuni transversale prin frunză şi se montează între lamă şi lamelă, după ce în prealabil secţiunile au fost ţinute câteva secunde în alcool de 90-95°, în vederea îndepărtării aerului dintre formaţiunile cerifere epicuticulare.
- ●●● Se efectuează secţiuni transversale la baza unui internod tulpinal şi se procedează ca în exemplul anterior.

C. Observaţii:

- Pe faţa inferioară a frunzelor se observă două dungi albicioase de ceară, dispuse longitudinal, de o parte şi de alta a nervurii mediane (Fig. 84 A).

Scanned with OKEN Scanner

●● Pe suprafaţa celulelor epidermei inferioare şi a cuticulei se observă ceară depusă sub formă de bastonaşe ale căror extremităţi libere apar curbate sau formând bucle (Fig. 84 B).

●●● Pe suprafaţa cuticulei ce acoperă celulele epidermice se observă ceară depusă sub formă de bastonaşe (Fig. 84 C).

D. Interpretare:

Ceara conferă pereţilor celulari impermeabilitate, împiedicând transpiraţia excesivă, adeziunea apei de ploaie sau de rouă la suprafaţa organelor aeriene, precum şi germinarea unor spori de ciuperci parazite.

Datorită stratului de ceară, pereţii externi ai celulelor epidermice apar la microscop strălucitori; reflectând razele de lumină, ei protejează astfel organele aeriene ale plantei împotriva insolaţiei.

Ceara, substanţă de natură lipidică, este insolubilă în apă, insolubilă sau greu solubilă în alcool rece; în alcool fierbinte, eter şi cloroform se dizolvă complet.

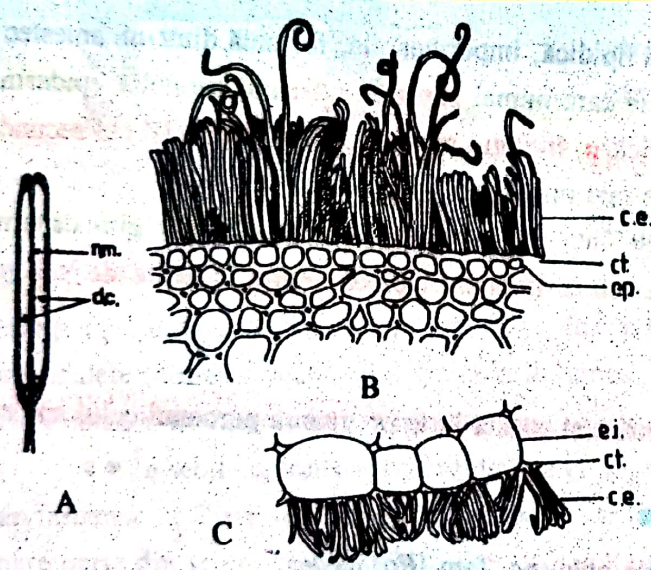


Fig. 84. Ceară epicuticulară pe faţa inferioară a frunzei de brad (*Abies alba*) (A), sâlcie (Salix alba) (B), la baza internodurilor tulpinale de trestie de zahăr (*Saccharum officinarum*) (C); aspect macroscopic (A), secţiuni transversale (B, C); c.e.- ceară epicuticulară; ct. - cuticulă; ep. - epidermă; e.i. - epidermă inferioară (d. A, B-orig.; C-Nultsch)

3° Suberificarea

Constă în depunerea prin apoziţie, pe faţa internă a peretelui primar, a unor lamele subţiri de suberină.

A. Material:

● Ramuri de soc (*Sambucus nigra*, fam. *Caprifoliaceae*)

B. Reactivi:

Roşu Sudan III

C. Protocol experimental:

Se utilizează preparate permanente cu secţiuni transversale prin periderma ramurii,

colorate cu roşu Sudan III.

D. Observaţii:

Procesul suberificării cuprinde mai multe straturi de celule (de formă tabulară şi dispuse radiar) rezultând suberul (pluta), ce reprezintă un ţesut protector secundar, impermeabil (suberina este o substanţă de natură lipidică), elastic şi care asigură apărarea ţesuturilor interne împotriva uscăciunii şi contra unor temperaturi ridicate. În urma suberificării peretelui celular, celulele mor şi se umplu cu aer. Ţesuturile vii situate sub acest suber rămân în legatură cu mediul extern prin lenticele, formaţiuni cu rol în schimbul de gaze dintre plantă şi mediul extern.

Celulele periferice ale suberului apar dreptunghiular-turtite, cu pereţii mult îngroşaţi şi cu lumenul relativ redus. Prin tratarea secţiunilor cu roşu Sudan III, păturile suberificate ale peretelui se colorează în roşu (Fig. 85).

E. Interpretare:

Suberina este o substanţă de natură lipidică, impermeabilă, formată dintr-un amestec de acizi graşi. Spre deosebire de cutinizare, la care numai peretele extern al celulelor epidermice se impregnează cu cutină, în cazul suberificării, întregul perete celular (în special cel secundar) se impregnează cu suberină, fiind afectate mai multe straturi celulare.

Suberificarea pereţilor celulari este întâlnită numai la angiosperme şi gimnosperme, reprezentând un proces de adaptare a acestora împotriva pierderilor exagerate de apa prin transpiraţie.

4° Lignificarea

Este caracteristică plantelor superioare şi constă în impregnarea peretelui celulozic cu o substanţă numită lignină.

A. Material:

- Fruct (poamă) de gutui (*Cydonia oblonga*, fam. *Rosaceae*)
- Pedunculul fructului de păr (*Pyrus sativa*, fam. *Rosaceae*)

B. Reactivi:

Sulfat de anilină (dizolvat în apă până la saturaţie + acid sulfuric)

Fluoroglucină (în soluţie alcoolică + acid clorhidric)

C. Protocol experimental:

- Se efectuează secţiuni transversale prin zona centrală a fructului de gutui, situată în vecinătatea lojelor ovariene şi se colorează atât cu sulfat de anilină, cât şi cu fluoroglucină.

Scanned with OKEN Scanner

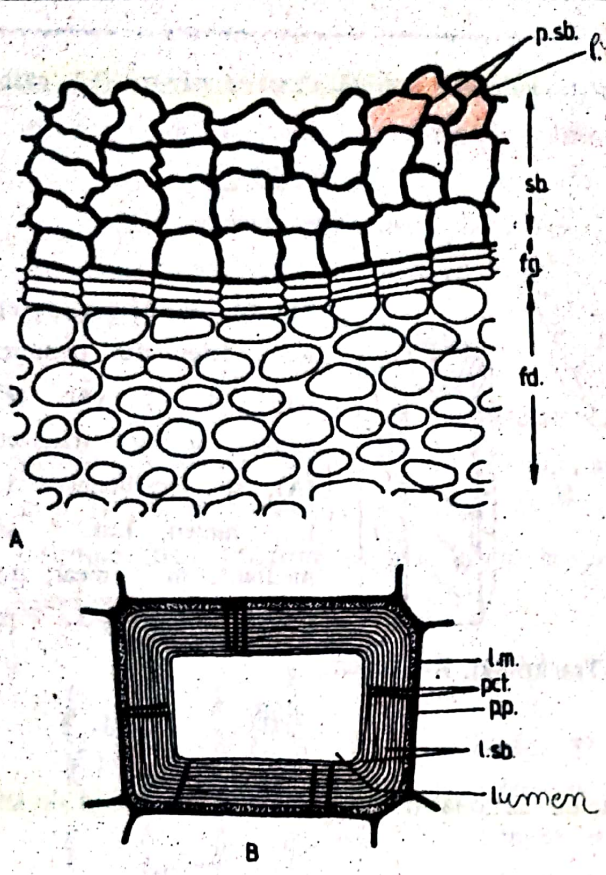


Fig. 85. Suberificarea pereţilor celulelor de suber: fragment din periderma unei ramuri de soc (*Sambucus nigra*), secţiune transversală (A); celulă cu pereţii suberificaţi (B); **fd.** - feloderm; **fg.** - felogen; **lm.** - lumen; **l.m.** - lamelă mediană; **l.sb.** - lamele de suberină; **pct.** - punctuaţie; **p.p.** - perete primar; **p.sb.** - pereţi suberificaţi; **sb.** - suber (d. A - orig.; B - Nultsch)

●● Se utilizează preparate permanente ce conţin secţiuni transversale prin peduncul, colorate cu sulfat de anilină.

D. Observaţii:

● Printre celulele parenchimatice cu pereţi subţiri, celulozici, ce formează partea cărnoasă a fructului, din loc în loc se observă celule izolate, izodiametrice sau grupuri de celule poligonal-alungite cu pereţi uniform îngroşaţi şi cu lumen foarte redus, numite **sclereide.** În grosimea pereţilor celulari se observă straturi concentrice lignificate ce se depun centripet şi numeroase punctuaţii canalicule, foarte fine, simple sau ramificate, ce comunică cu canaliculele celulelor vecine şi se deschid în lumen. Datorită acestei modificări, sclereidele sunt celule moarte la maturitate şi alcătuiesc un ţesut scleros.

●● În secţiune transversală se disting grupe de **sclereide** sau sclereide izolate şi cordoane sau fascicule de **fibre sclerenchimatice** localizate în scoarţă, iar măduva este formată în cea mai mare parte din sclereide (Fig. 86)

E. Interpretare:

Lignina, substanţă fenolică se infiltrează în spaţiile intermicelare şi interfibrilare, cimentând elementele structurale ale peretelui celulozic, determinând mărirea rezistenţei şi micşorarea flexibilităţii acestora.

Lignificarea poate fi **totală** la elementele sclerenchimatice (fibre, sclereide) sau **parţială** la vasele conducătoare lemnoase.

Scanned with OKEN Scanner

Lignina poate fi evidenţiată prin tratare cu sulfat de anilină, când se colorează în galben-auriu şi cu fluoroglucină când se colorează în roşu-vişiniu.

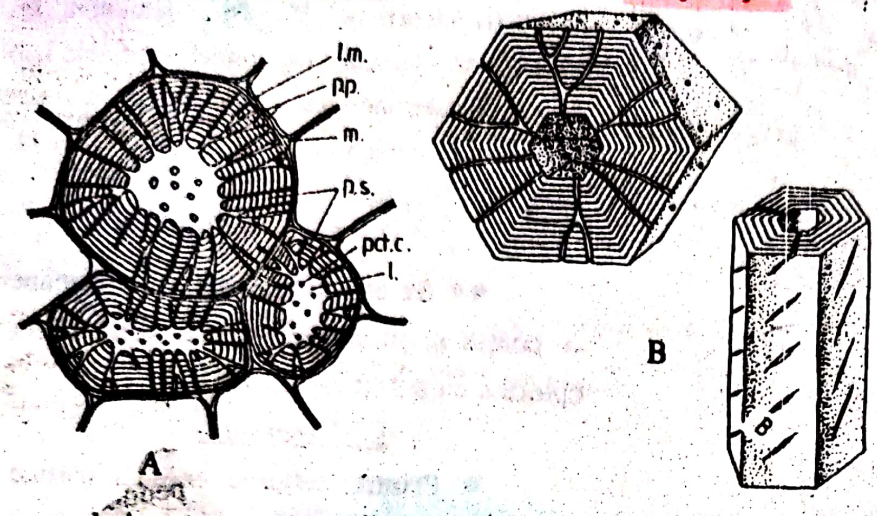


Fig. 86. Lignificarea pereţilor sclereidelor din pedunculul fructului de păr (*Pyrus sativa*), secţiune transversală (A); aspect tridimensional (B); l. - lumen; l.m. - lamelă mediană; m. - meat; p.p. - pereţi primari; p.s. - pereţi secundari; pct.c. - punctuaţii canaliculare (d. A-Trankovski; B-Nultsch)

5° Mineralizarea

Constă în încrustarea peretelui celular cu carbonat de calciu ($CaCO_3$), dioxid de siliciu (SiO_2) şi acid silicic ($Si(OH)_4$).

Celulele cu pereţii silicifiaţi sunt mult răspândite în regnul vegetal, atât la plantele inferioare (tecile diatomeelor), cât şi la plantele superioare (din fam. *Equisetaceae, Gramineae, Cyperaceae*).

Calcifierea peretelui celular este una dintre mineralizările cele mai frecvente, care se observă la reprezentanţii multor grupe de alge, cum ar fi: *Characeae, Rhodophyceae, Chlorophyceae* şi la unele plante superioare, cum sunt: *Brassicaceae, Boraginaceae, Moraceae*.

Prin procesul de mineralizare, pereţii celulari devin mai rezistenţi şi nu se deformează.

- ***Mineralizarea cu SiO_2***

A. Material:

- Frunze de porumb (*Zea mays*, fam. *Poaceae*)

B. Protocol experimental:

Se desprinde un fragment de epidermă proaspătă de pe una din feţele limbului foliar şi se aşează pe o plăcuţă de argint susţinută de o tijă metalică prevăzută cu un mâner de lemn. Se încălzeşte puternic la flacără până la ardere (aproximativ 5 minute), până când secţiunea devine brună. Apoi se adaugă peste materialul astfel obţinut, câteva picături de H_2SO_4 (5-10 minute).

Scanned with OKEN Scanner

Se spală repede cu apă şi se mai adaugă 1-2 picături de HCl (câteva secunde), după care se spală din nou cu apă distilată. În cele din urmă secţiunea se montează în glicero-gelatină.

C. Observaţii:

Prin arderea epidermei, forma şi structura peretelui celular impregnat cu SiO_2 se păstrează; la microscop se observă scheletul silicifiat al celulelor epidermice lungi şi scurte şi al celulelor stomatice (Fig. 87).

D. Interpretare:

Prezenţa SiO_2 în peretele celular se poate evidenţia prin procesul microincinerării. Dacă pereţii celulari cu conţinut ridicat în siliciu sunt incineraţi, imaginea lor poate rămâne intactă prin distrugerea substanţei organice. Astfel de imagini microscopice ale scheletelor minerale obţinute prin microincinerarea unor secţiuni subţiri printr-un ţesut vegetal se numesc spodograme.

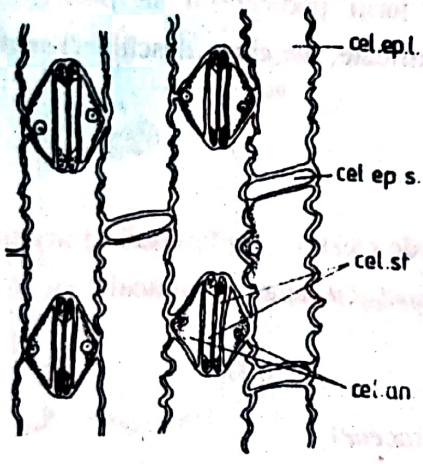


Fig. 87. Spodograma epidermei superioare siliciflate a frunzei de porumb (*Zea mays*), secţiune superficială; **cel.** - celule (**an.** - anexe, **ep.l.** - epidermică lungă, **ep.s.** - epidermică scurtă, **st.** - stomatice (d. Kaussmann)

● ***Mineralizarea cu $CaCO_3$***

A. Material:

● Frunze de *Ficus elastica*, fam. *Moraceae*

B. Reactiv:

Acid acetic

C. Protocol experimental:

Se efectuează secţiuni transversale prin limbul foliar proaspăt.

Se execută preparate temporare care se examinează imediat. Se pune în evidenţă prezenţa $CaCO_3$ în pereţii unor celule din frunză, prin tratarea secţiunii cu acid acetic; 1-2 picături de acid acetic, adăugate sub lamelă, determină dizolvarea cistolitului.

D. Observaţii:

Examenul microscopic evidenţiază următoarele zone: o epidermă superioară tristratificată, o epidermă inferioară unistratificată şi între ele, mezofilul frunzei. Pe suprafaţa epidermei

Scanned with OKEN Scanner

superioare se observă o cuticulă groasă. Celulele epidermice din primul strat sunt mici şi izodiametrice, cele din stratul al doilea sunt cam de două ori mai mari decât primele, iar în stratul al treilea se observă unele voluminoase, care pătrund în mezofilul frunzei. În interiorul acestor celule apar concreţiuni calcaroase numite **cistoliţi.** Acestea se formează prin impregnarea cu $CaCO_3$ a unor îngroşări centripetale locale ale peretelui celulozic extern al celulelor epidermice din primul strat.

Cistolitul este alcătuit dintr-un pedicel pecto-celulozic, impregnat cu siliciu, prin care rămâne legat de peretele celular şi din partea mamelonată cu aspect de ciorchine, impregnată cu $CaCO_3$. Celula cu cistolit rămâne vie, cu toate că formaţiunea îi ocupă aproape tot lumenul (Fig. 88).

D. Interpretare:

După reacţia dintre carbonatul de calciu şi acidul acetic, rămâne doar scheletul cistolitului de natură celulozică, cu o structură stratificată. În jurul pedicelului se disting straturi concentrice, precum şi canalicule radiare simple sau ramificate, ale căror deschideri se observă la marginea scheletului format din celuloză pură.

6⁰ Gelificarea

Constă într-o hipersecreţie de substanţe pectice, de către protoplast sau în acumularea, în pereţii celulari, a acestor substanţe, care în contact cu apa se înmoaie şi se umflă transformându-se într-o masă gelatinoasă.

A. Material:

- Seminţe de gutui (***Cydonia oblonga,*** fam. ***Rosaceae)***

B. Protocol experimental:

Secţiunea transversală prin sămânţă se observă mai întâi în stare uscată, între lamă şi lamelă. Adăugându-se sub lamelă câteva picături de apă, în timp ce preparatul este observat la microscop, se constată că peretele extern al celulelor epidermice din testă (stratul extern al tegumentului seminal), în urma îmbibării cu apă se gelifică.

C. Observaţii:

Peretele extern al celulelor epidermice din testă, în contact cu apa, se umflă şi se transformă într-un gel (mucilagiu). Gelul format, presând asupra cuticulei şi a păturii cutinizate a peretelui celular, determină ruperea acestora, şi se acumulează sub forma unui strat mai mult sau mai puţin omogen la suprafaţa secţiuni transversale (Fig. 89).

Scanned with OKEN Scanner

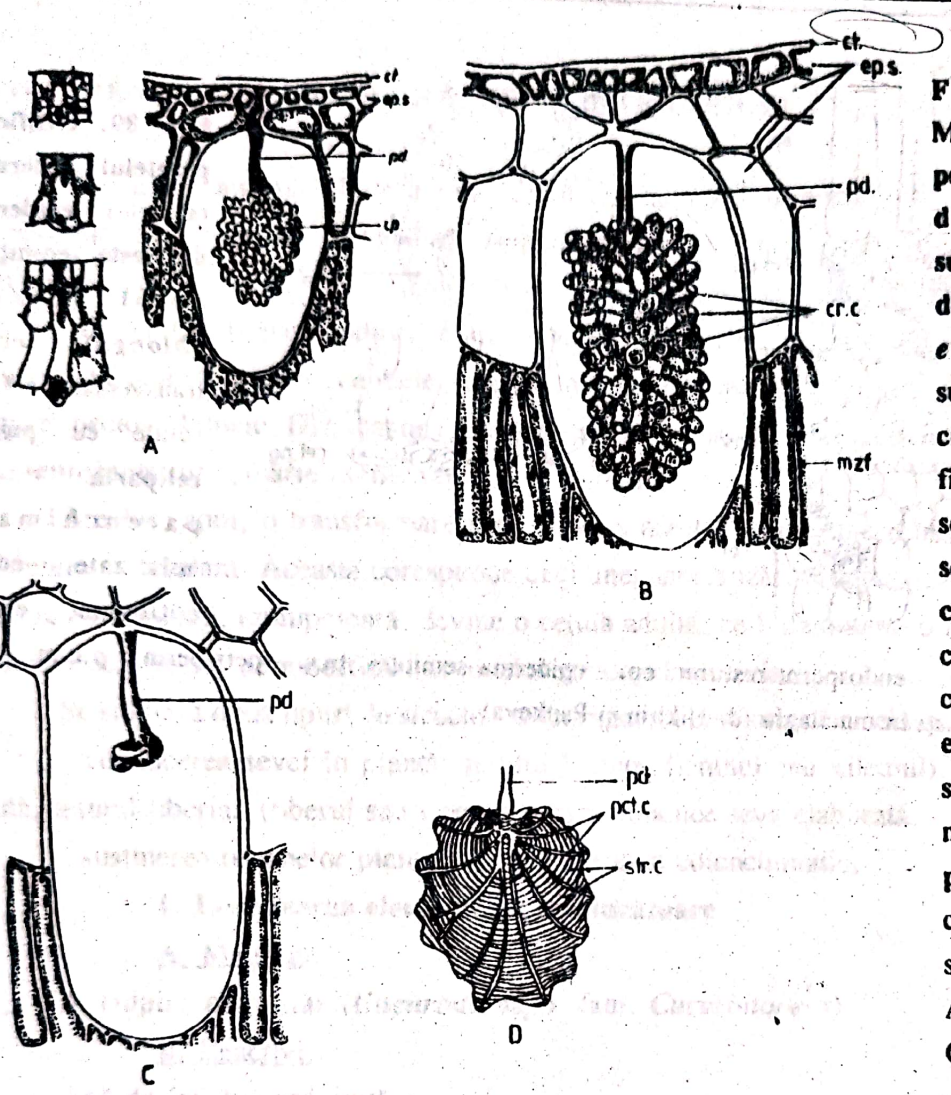


Fig. 88. Mineralizarea peretelui unei celule din epiderma superioară a frunzei de ficus (*Ficus elastica*): stadii succesive de formare a cistolitului (A); stadiu final (B); pedicel (C); schelet celulozic (D), secţiuni transversale; cp. - corp; ct. - cuticulă; cr.c. - concreţiuni calcaroase; ep.s. - epiderma superioară; mzf. - mezofil; pd. - pedicel; pct.c - punctuaţii canaliculare; str.c. - straturi concentrice (d. A-Strasburger; B, C-Centova; D-Troll)

D. Interpretare:

Mucilagiile se pot forma, nu numai prin gelificarea păturilor externe ale peretelui celular, ci şi a celor mijlocii sau interne, uneori chiar prin gelificarea peretelui în totalitate. Ele pot să apară, atât superficial, ca exudate ale peretelui celular, cât şi intern, ca substanţe vacuolare, aşa cum se observă la **celulele mucilagigene** din frunzele şi petalele unor specii din familia *Malvaceae.*

Rolul gelificării peretelui celular este acela de protecţie, astupând rănile produse plantei; alteori protejează mugurii şi frunzele tinere sau ajută la punerea în libertate a sporilor şi gameţilor.

Scanned with OKEN Scanner

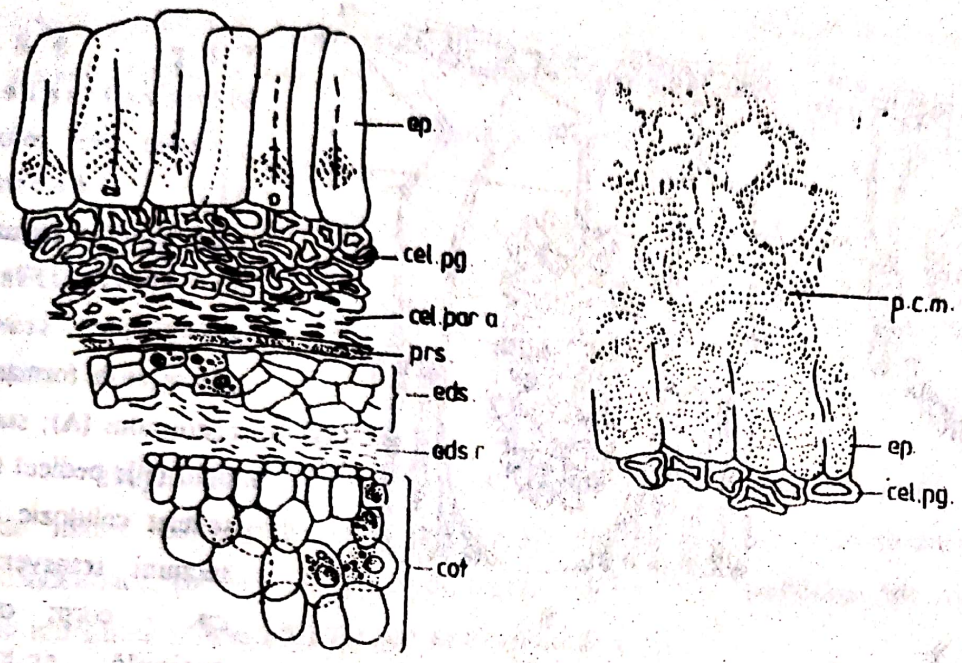


Fig. 89. Gelificarea peretelui extern al celulelor epidermice din testa seminţei de gutui (*Cydonia oblonga*); secţiuni transversale, **cel.pg.** - celule cu pigment; **cel.par.a.** - celule parenchimatice aplatizate; **cot.** - cotiledon; **eds.** - endosperm; **eds.r.** - endosperm resorbit; **ep.** - epiderma seminţei; **prs.** - perisperm ; **p.c.m.** - pereţi celulari transformaţi în mucilagiu (d. Nikitin şi Pankova)

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL VIII

DIFERENŢIEREA CELULARĂ: ELEMENTE CONDUCĂTOARE ŞI MECANICE

Într-un organ vegetal pe cale de dezvoltare, cum ar fi o rădăcină sau o tulpină, creşterea în lungime este asigurată plecând de la anumite centre active de diviziune celulară numite meristeme primare (apicale, terminale): radicular şi caulinar; creşterea în grosime este asigurată plecând de la funcţionarea altor centre, numite meristeme secundare (laterale): cambiu şi felogen. În ambele cazuri, celulele sunt la început mici, izodiametrice; peretele celular este subţire, pecto-celulozic, fără meaturi; nucleul este mare, iar citoplasma densă; aparatul vacuolar este reprezentat prin foarte numeroase vacuole mici.

Are loc, apoi, o transformare progresivă a acestor celule tinere în celule adulte, adică diferenţierea celulară. Aceasta corespunde deci unei specializări progresive a celulelor: o celulă în stare embrionară, omnipotentă, devine o celulă adultă, ce îndeplineşte o funcţie determinată. Procesul este însoţit de modificări la nivelul structurilor celulare.

Se studiază două tipuri de structuri diferenţiate, constituite din celule a căror funcţie este:

- conducerea sevei în plantă: ţesutul lemnos (lemnul sau xilemul), care conduce seva brută; ţesutul liberian (liberul sau floemul), care conduce seva elaborată.
- susţinerea organelor plantei: ţesutul mecanic colenchimatic.

1. Localizarea elementelor conducătoare

A. Material:

- Tulpină de bostan (***Cucurbita pepo***, fam. *Cucurbitaceae*)

B. Reactivi:

Apă de Javel concentrată

Dublă coloranţie: carmin alaunat (nacarat), verde iod

C. Protocol experimental:

Se execută secţiuni transversale şi longitudinale foarte subţiri prin tulpină. Secţiunile sunt imersate în apă de javel concentrată, timp de 30 de minute. Acest procedeu permite eliminarea tuturor constituenţilor celulari; nu rămân decât pereţii scheletici. Se spală apoi secţiunile cu apă. Se imersează secţiunile pe rând, în cei doi coloranţi: în verde iod, timp de 5 minute şi în carmin, timp de 20 minute. Se clătesc cu apă şi se montează cele mai fine secţiuni în apă, între lamă şi lamelă.

Scanned with OKEN Scanner

D. Observaţii:

1⁰ Secţiune transversală (schemă generală şi un fascicul conducător)

Dubla coloraţie afectează în două moduri peretele celulelor, după natura lui chimică: pereţii celulozici devin roz, cei care sunt lignificaţi, verzi. Aceasta permite a identifica cele două tipuri de ţesuturi.

Fasciculele conducătoare, dispuse pe unul sau două cercuri concentrice, sunt localizate în centrul secţiunii (în cilindrul central): ele constituie mase compacte şi bine individualizate, într-un parenchim colorat în roz. Fiecare are de o parte şi de alta a unui ţesut (xilem) colorat în verde, un alt ţesut, (floem: floem extern şi floem intern) colorat în roz. Se observă o zonă meristematică (procambiu), cu celule foarte turtite, al căror perete subţire este colorat în roz (Fig. 90 A-a).

2⁰ Secţiune longitudinală

Localizarea elementelor conducătoare este mai grea decât precedenta: trebuie căutate, mai întâi ţesuturile lignificate, colorate în verde; ele sunt de două feluri: sclerenchimul (ţesut mecanic) şi vasele lemnoase (ţesut conducător). Primul, este constituit din celule ale căror pereţi transversali sunt foarte oblici. Al doilea, care interesează de fapt, are celule ai căror pereţi, de asemenea verzi, sunt ornamentaţi în mod diferit: acestea sunt vasele de lemn. Cât despre floem, se observă celule roz, alungite, de lărgime variabilă şi situate de o parte şi de alta a masei vaselor de lemn (Fig. 90 B).

1.1. ***Studiul ţesutului lemnos***

A. Observaţii:

Acesta este un ţesut heterogen, fomat din diferite elemente: vasele conducătoare ale sevei brute, celulele parenchimatice (cu pereţi celulozici sau lignificaţi) care înconjoară aceste vase. Toate aceste elemente sunt vizibile atât în secţiune transversală, cât şi în secţiune longitudinală.

1⁰ Secţiune transversală

Vasele unui fascicul conducător prezintă un lumen celular al cărui diametru variază după vârsta lor; talia lor creşte de la centru spre exteriorul secţiunii: cele mai strâmte, situate spre centrul secţiunii, sunt primele formate (cele mai vechi); ele constituie protoxilemul; cele mai largi, situate aproape de (pro)cambiu, sunt ultimele formate (cele mai tinere); ele formează metaxilemul.

Între elementele caracteristice ale ţesutului lemnos există celule parenchimatice poligonale, ale căror pereţi pot fi impregnaţi sau nu cu lignină (Fig. 90 A-b).

Scanned with OKEN Scanner

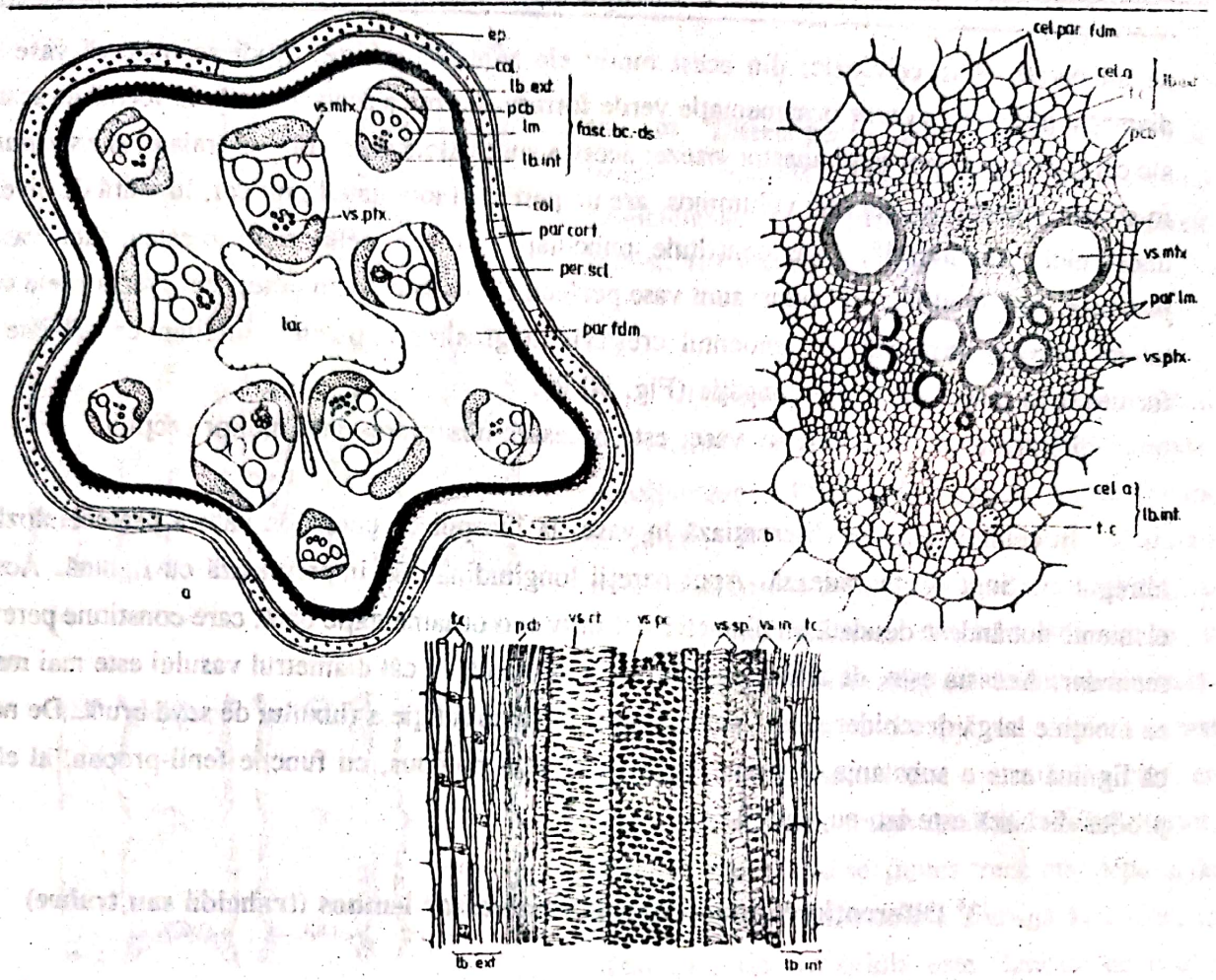


Fig. 90. Fascicul conducător bicolateral deschis la bostan (*Cucurbita pepo*): secțiune transversală prin tulpină (**A**: schemă - **a**, detaliu - **b**), secțiune longitudinală printr-un fascicul (**B**); **cel.** - celulă (**a** - anexă, **par.fdm** - de parenchim fundamental); **col.** - colenchim, **ep.** - epidermă; **fasc.bc.ds.** - fascicul bicolateral deschis; **lb.** - liber (**ext** - extern, **int** - intern); **lm.** - lemn; **lac.** - lacună medulară; **par.** - parenchim (**cort.** - cortical, **fdm** - fundamental, **lm.** - lemnos); **per.scl.** - periciclu sclerenchimatic; **pcb.** - procambiu; **t.c.** - tub ciuruit; **vs.** - vas (**in.** - inelat, **mtx.** - de metaxilem, **pt.** - punctat; **ptx.** - de protoxilem; **rt.** - reticulat; **sp.** - spiralat (**d.A**-orig.; **B**-Morlova)

2⁰ Secțiune longitudinală

Acest tip de secțiune permite observarea structurii pereților vaselor:celulozei se adaugă o impregnare verde de lignină, care poate lua forme variate, după vârsta și deci după talia vasului. Primele formate prezintă o ornamentație în formă de inele spațiale sau de elice (spiră), simple sau duble: acestea sunt vasele *inelate* și *spiralate*. Lumenul lor este secționat în interior

de un perete oblic celulozic; din acest motiv ele sunt imperfecte. Apoi se observă vase de diametru mijlociu, a căror ornamentaţie verde formează o reţea scalariformă, în formă de scară, ale cărei bare pot apoi să se anastomozeze; acestea sunt vasele *scalariforme* (raiate) şi *reticulare*. În sfârşit, ultimul tip, cel mai voluminos, are un perete în totalitate lignificat, în afară de nivelul unor mici "deschideri", care constituie punctuaţii, rămase celulozice; acestea sunt vasele *punctate*. Aceste ultime trei tipuri sunt vase perfecte, deoarece nu au pereţi transversali; ele sunt tuburi care se formează în momentul creşterii în grosime a plantei, în timp ce celelate se formează în timpul fazei de elongaţie (Fig. 90 B).

Pentru a studia o serie de vase, este necesară observarea mai multor secţiuni.

B. Interpretare:

În celulele care se diferenţiază în vase, la început cu pereţi de natură pectocelulozică, întregul conţinut se degradează. Apoi pereţii longitudinali se impregnează cu lignină. Aceste elemente dobândesc deodată un diametru definitiv şi o ornamentaţie dată, care constituie peretele secundar. Aceasta este, de altfel, cu atât mai importantă cu cât diametrul vasului este mai mare; ea menţine largă deschiderea lor, pentru o mai bună circulaţie a fluxului de sevă brută. De notat că lignina este o substanţa organică, polimer al unui compus, cu funcţie fenil-propan, al cărui produs de bază este izo-eugenolul.

3° Diferenţierea unui element conducător lemnos (traheidă sau trahee)

Un vas lemnos, de exemplu o trahee, provine dintr-un şir de celule procambiale sau cambiale. Celulele meristematice cresc, iar citoplasma elaborează multă celuloză şi lignină, astfel încât pereţii se îngroaşă treptat, neuniform sau uniform, şi se lignifică. În paralel, vacuolele confluează într-o vacuolă unică, centrală, mare, citoplasma scade, nucleul degenerează şi dispare, după care dispare şi citoplasma cu toate organitele din ea, iar pereţii transversali dintre celule se resorb, rezultând astfel un tub lung, mort la maturitate, cu pereţii laterali diferit îngroşaţi. În cazul traheidelor, pereţii transversali dintre celule persistă.

1.2. *Studiul ţesutului liberian*

A. Observaţii:

Este, de asemenea, un ţesut heterogen, ale cărui elemente caracteristice sunt tuburile ciuruite, constituite din celule ciuruite dispuse cap la cap, lângă care se găsesc alipite celule anexe şi celule parenchimatice.

Scanned with OKEN Scanner

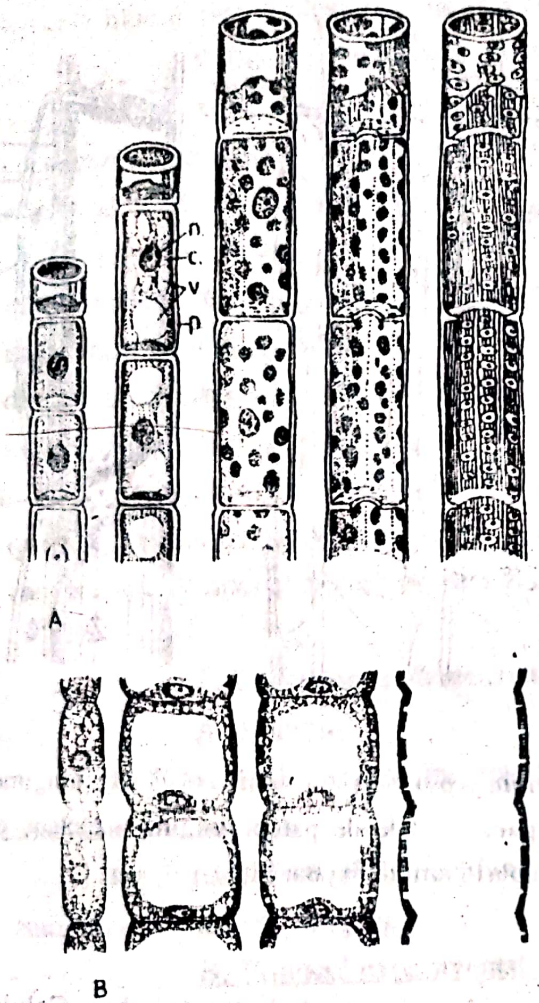


Fig. 91. Diferenţierea unui element conducător lemnos: traheidă (A), trahee (B), secţiuni longitudinale; **c.** - citoplasmă; **n.** - nucleu; **p.** - perete celular; **v.** - vacuole (d. Nultsch)

1°. Secţiune transversală

Tuburile ciuruite sunt secţionate la nivelul articulelor care le constituie: celule poligonale, necolţuroase (fără unghiuri), cu perete pecto-celulozic, de aspect sidefiu. Când secţiunea transversală trece prin peretele transversal al unui tub se poate observa, în lumenul celular o multitudine de perforaţii, de formă poligonală, legate între ele printr-o reţea de celuloză; acest ansamblu constituie o placă ciuruită sau ciur, ce reprezintă peretele transversal al tubului ciuruit, văzut de faţă. Când secţiunea trece mai departe de placa ciuruită, este o celulă ciuruită fără ciur. În acest caz, fiecare celulă este flancată de o altă celulă, mai mică, adesea de formă trapezoidală; aceasta este celula anexă. Celule parenchimatice înconjoară toate aceste elemente caracteristice, care diferă de celulele parenchimului fundamental vecin doar prin mărime (Fig. 90 A, 92 A).

2°. Secţiune longitudinală

Tubul ciuruit, format din celule ciuruite lungi, se umflă la nivelul peretelui transversal (orizontal sau uşor oblic); placa ciuruită este văzută aici în secţiune şi arată perforaţii sau pori între elemente pecto-celulozice, veritabile prelungiri ale peretelui longitudinal al tubului. Porii ciurului astfel definiţi sunt uneori acoperiţi de caloză, ce constituie un calus. În felul acesta circulaţia sevei elaborate este încetinită toamna. În lungul fiecărei celule ciuruite se observă o celulă mai îngustă (strâmtă): este celula anexă, al cărui perete comportă punctuaţii înspre celula ciuruită (Fig. 90 B; 92 B, C).

Scanned with OKEN Scanner

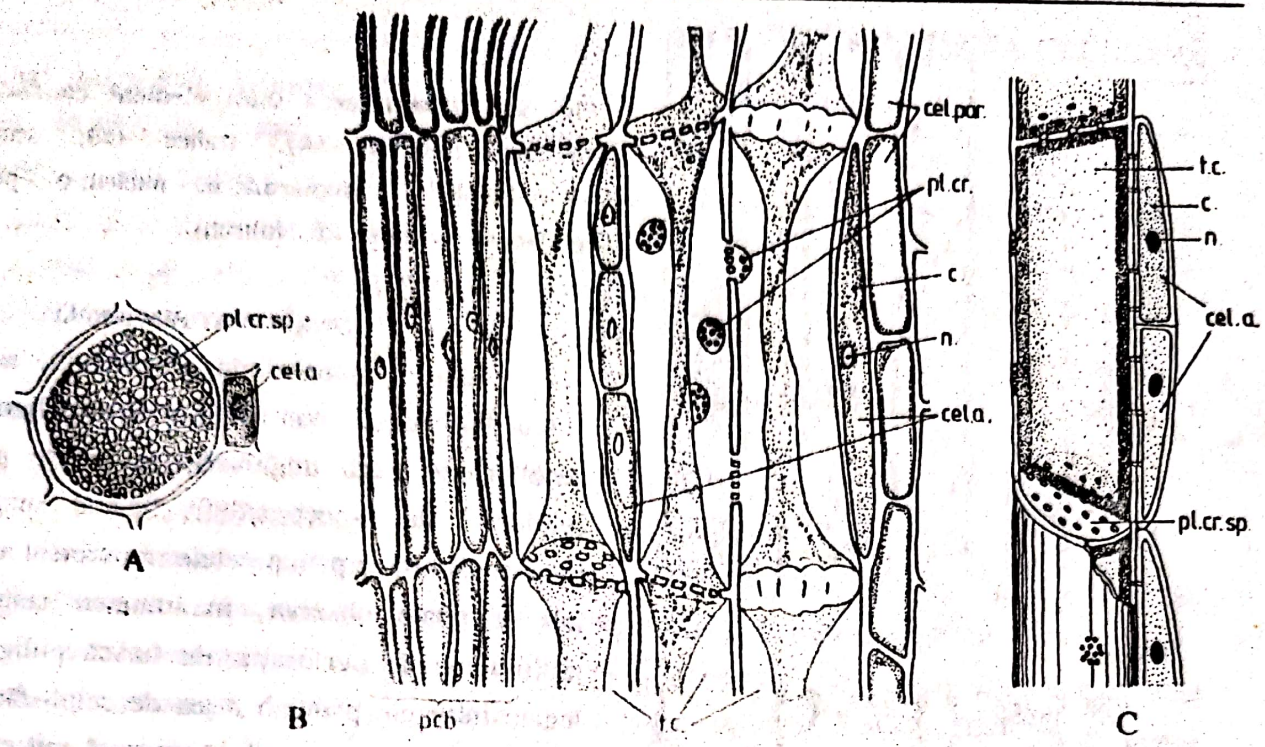


Fig. 92. Ţesut liberian în tulpina de bostan (*Cucurbita pepo*), secţiuni: transversală **(A)**, longitudinale **(B, C)**; **c.** - citoplasmă; **cel.a.** - celule anexe; **c.par.** - celule de parenchim; **n.** - nucleu; **pcb.** - procambiu; **pl.cr.sp.** - placă ciuruită simplă; **t.c.** - tuburi ciuruite (d. Barîkina)

B. Interpretare:

Diferenţierea celulară a acestor elemente are loc plecând de la (pro)cambiu. Celulele se vacuolizează, se alungesc şi peretele lor se îngroaşă cu celuloză. Apoi apare o stare premortală care afectează nucleul şi celelalte incluziuni ale hialoplasmei. Din acest motiv, fenomenele vitale se reduc şi nu persistă (nu se întreţin) decât la nivelul ciururilor. Celulele astfel constituite sunt celule ciuruite, celule în stare de degenerescenţă. Cât despre ciur, el se formează într-un perete transversal ce separă două celule ciuruite: apar îngroşări de celuloză, dispuse în reţea, în care persistă plaje (suprafeţe) de grosime mai mică; acestea din urmă constituie porii ciurului. Dimpotrivă, celula anexă îşi păstrează conţinutul intact. Se poate considera ca un element conducător rămas în stare potenţială, deoarece ea poate deveni o celulă ciuruită.

Aceste două tipuri de ţesuturi sunt constituite din celule foarte specializate: vase de lemn, tuburi ciuruite. Structura lor adesea heterogenă, le localizează adesea în ţesuturile puţin diferenţiate cum sunt parenchimurile şi în "locuri" precise ale rădăcinii, tulpinii, frunzei. Rolul

lor este bine definţ la plante: acela de a conduce seva brută sau seva elaborată.

3° Diferenţierea unui element conducător liberian (ciuruit)

Sub apexul caulinar rămân cordoane lungi de celule meristematice procambiale, adesea cu vacuole relativ mari. O celulă procambială sau o celulă cambială se divide longitudinal, rezultând două celule egale, care însă se vor comporta diferit ulterior:

- o celulă se alungeşte şi se lărgeşte mult, vacuolele ei confluează, dând o vacuolă foarte mare, nucleul degenerează şi apoi dispare, iar în pereţii transversali (terminali) apar perforaţii, astfel încât rezultă o **celulă ciuruită**; mai multe astfel de celule, dispuse cap la cap, provenind din acelaşi şir de celule meristematice, formează **tubul ciuruit**, cu plăci ciuruite între celulele sau articulele lui componente;

- o celulă creşte mai puţin şi chiar se divide transversal, rezultând 1-2 **celule anexe** (prezente numai la angiosperme), care păstrează încă unele trăsături meristematice, având câteva vacuole relativ mici şi nucleu prezent adesea în poziţie centrală.

2. Localizarea elementelor mecanice

A. Material

● Tulpină de urzică moartă (***Lamium album***, fam. *Lamiaceae*) pentru studiul colenchimului angular

●● Peţiolul frunzei de pochivnic (***Asarum europaeum***, fam. *Aristolochiaceae*), pentru studiul colenchimului tangenţial

B. Protocol experimental

Se execută secţiuni transversale şi longitudinale, foarte subţiri, prin tulpina de urzică moartă şi prin peţiolul frunzei de pochivnic. Pentru realizarea preparatelor se folosesc secţiuni necolorate.

C. Observaţii

Celulele de colenchim, numite şi **colocite**, sunt prismatic alungite, vii, cu pereţii celulozo-pectici, adesea neuniform (angular sau tangenţial) îngroşaţi, în sens centripetal; în secţiune transversală au contur poligonal. În citoplasmă se observă nucleu, cloroplaste, granule de amidon ş.a.

Studiul colenchimului

● Conturul secţiunii transversale prin tulpina prismatică este pătratic. Cordoanele de **colenchim angular** sunt localizate în coaste şi sunt formate din celule poligonale, fără meaturi

Scanned with OKEN Scanner

între ele şi cu pereţii puternic îngroşaţi la colţuri, celulozici (strălucitori la microscop).

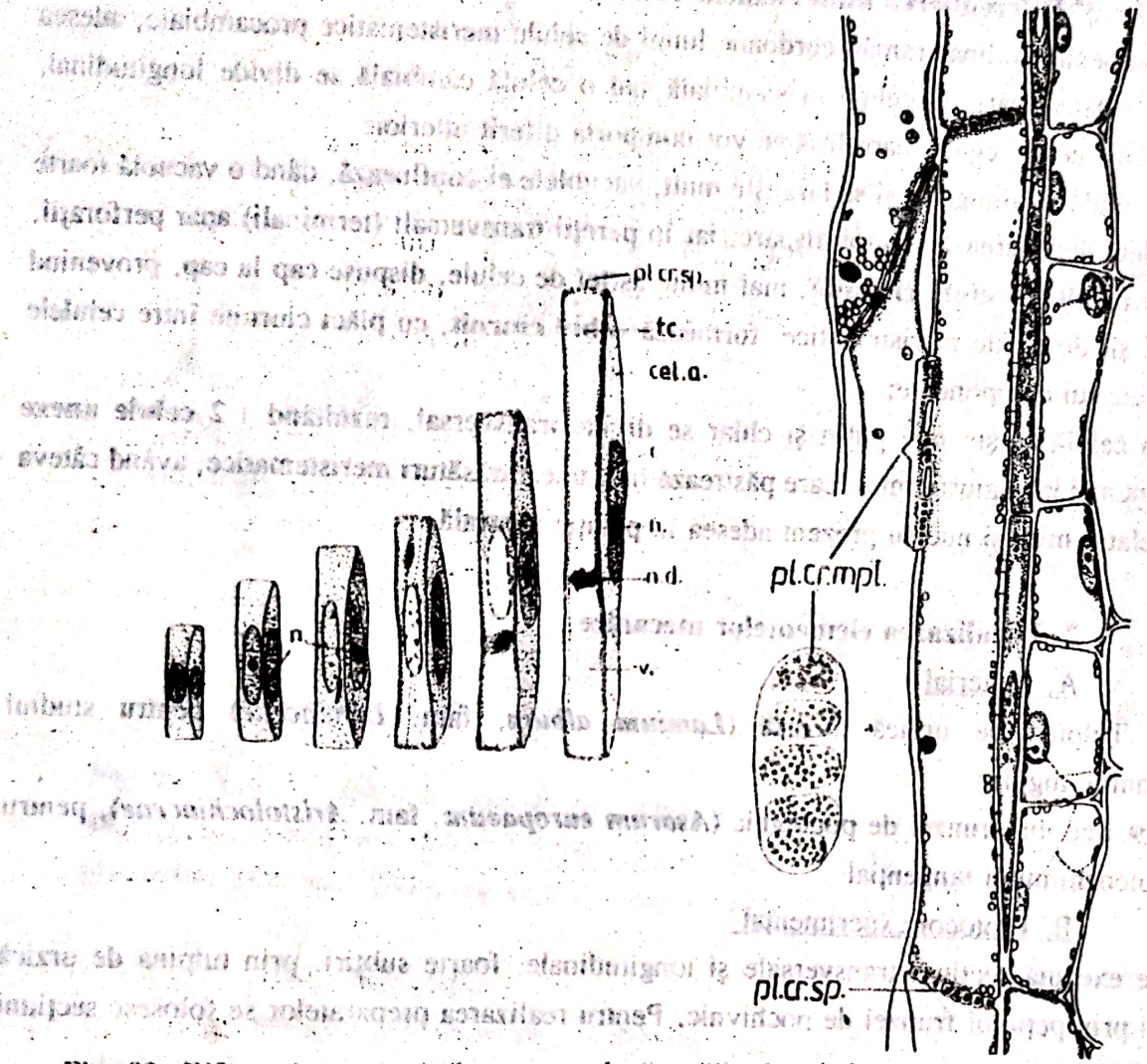


Fig. 93. Diferenţierea unui element conducător liberian (tub ciuruit), secţiuni longitudinale; **c.** - citoplasmă; **cel.a.** - celulă anexă; **n.** - nucleu, **n.d.** - nucleu degenerat; **pl.cr.sp.** - placă ciuruită simplă; **pl.cr.mlp.** - placă ciuruită multiplă; **t.c.** - tub ciuruit; **v.** - vacuolă (d. Strasburger)

În sacul citoplasmatic parietal se observă un nucleu şi cloroplaste, iar vacuola centrală este mare. Rareori se observă meaturi între celulele de colenchim (Fig. 94).

●● Conturul secţiunii transversale prin peţiol este eliptic-cordiform, cu un jgheab la faţa superioară (adaxială). Zona hipodermică este formată din **colenchim tangenţial** este formată din 2-4 straturi de celule poligonale, alungite tangential, cu pereţii tangenţiali (extern şi intern) puternic îngroşaţi, celulozici (strălucitori la microscop). Conţinutul celular prezintă nucleu şi cloroplaste

în sacul citoplasmatic parietal. Între celule, pe alocuri se observă meaturi mici (Fig. 95).

Pe secţiuni longitudinale, celulele de colenchim apar dreptunghiular-alungite, cu pereţii laterali (extern şi intern) puternic îngroşaţi şi pereţii transversali mai subţiri.

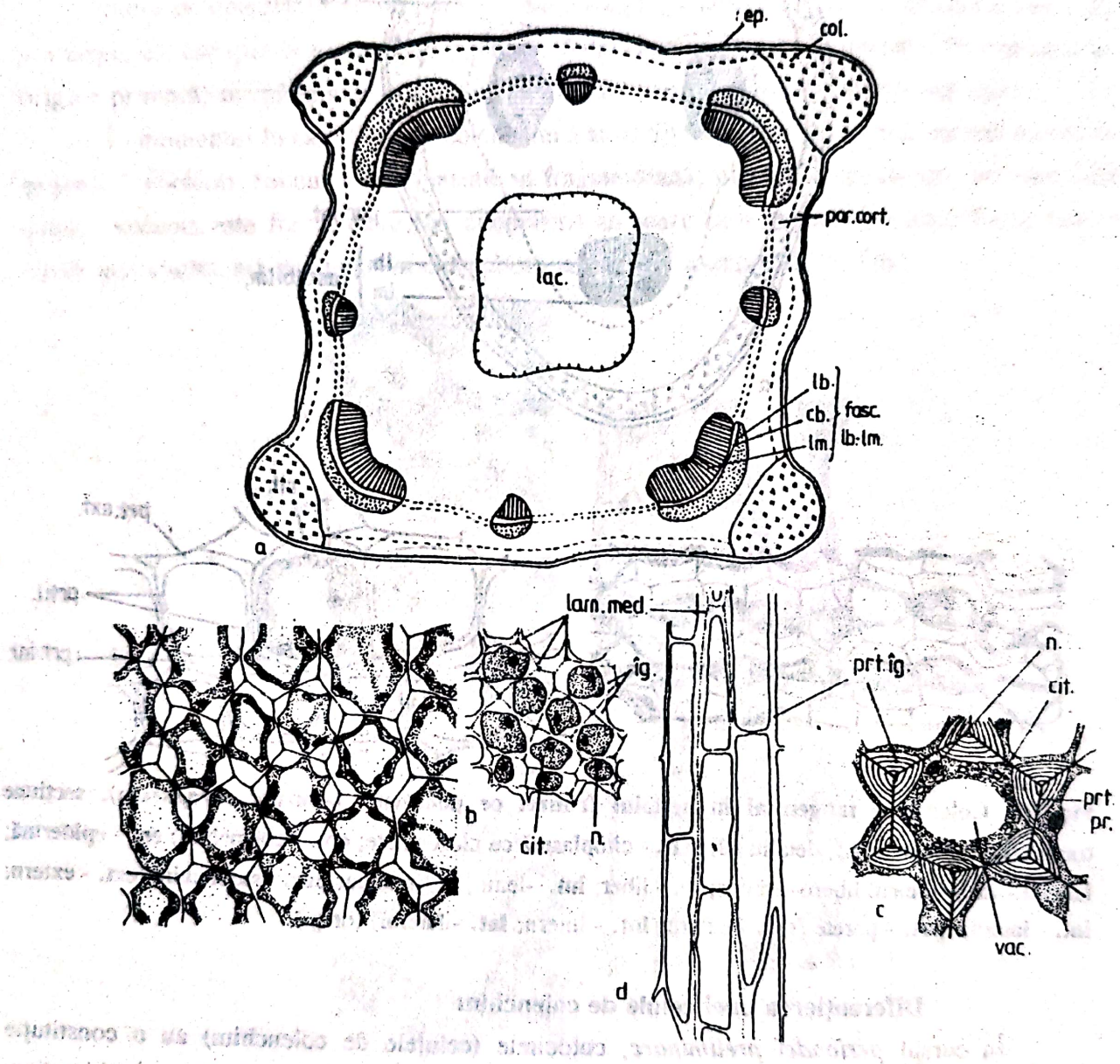


Fig. 94. Colenchim angular în tulpina de urzică moartă (*Lamium album*): ansamblu **(A)**, porţiuni de ţesut colenchimatic **(B)**, elemente de colenchim **(C, D)**; secţiuni: transversală (schemă-**A**, detalii-**B, C**), longitudinală (detaliu-**D**); **cb.** - cambiu; **cit.** -citoplasmă; **col.** - colenchim; **ep.** - epidermă; **fasc.lb.-lm.** - fascicul libero-lemnos; **lb.** - liber; **lm.** - lemn; **lac.** - lacună medulară; **lam.med.** - lamelă mediană; **n.** - nucleu; **par.cort.** - parenchim cortical; **prt.** - perete (**îg.** - îngroşat; **pr.** - primar); **vac.** - vacuolă (orig.)

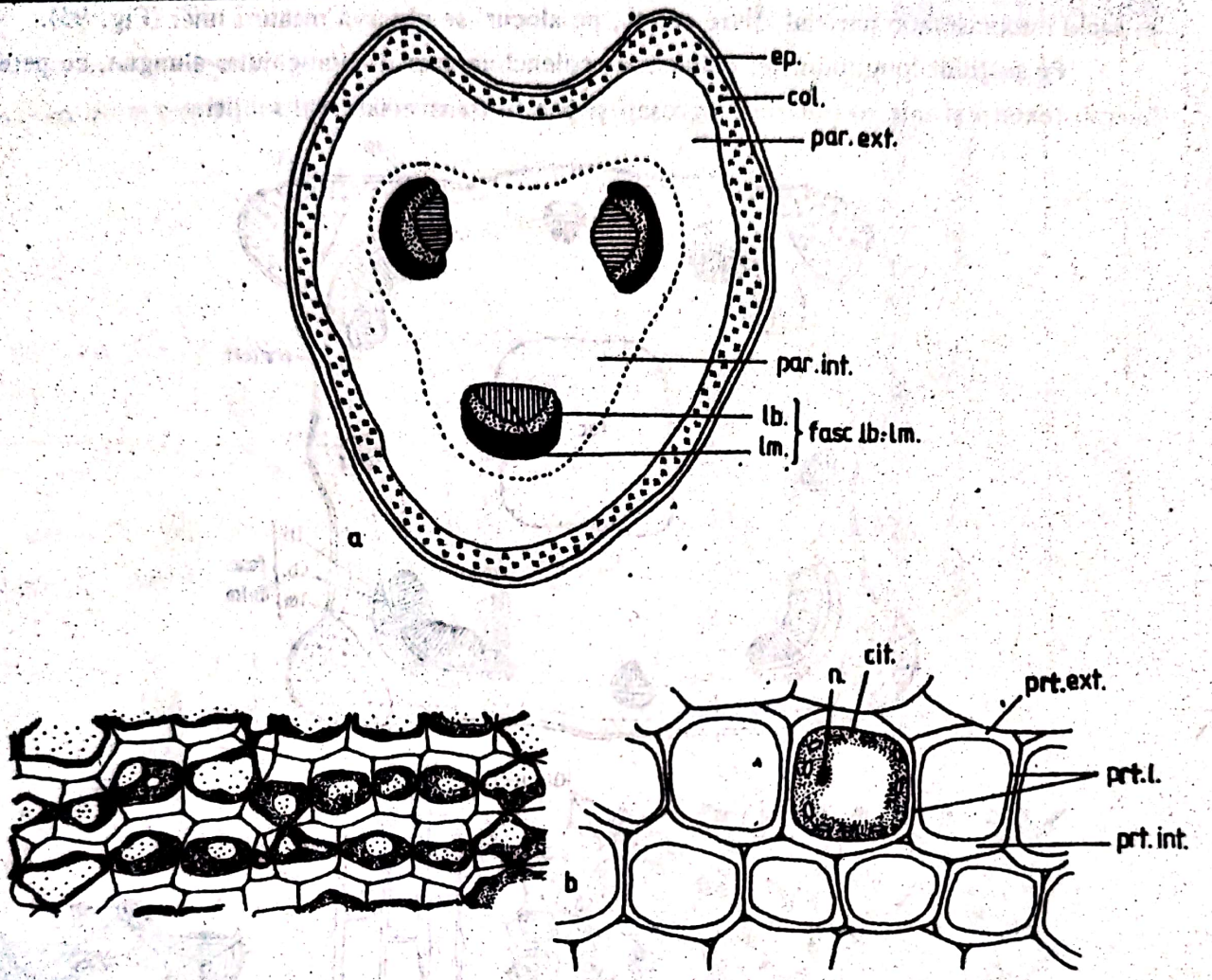


Fig. 95. Colenchim tangenţial în peţiolul frunzei de pochivnic (*Asarum europaeum*), secţiune transversală: schemă (A), detaliu (B); cit. - citoplasmă cu cloroplaste; col. - colenchim; ep. - epidermă; fasc.lb.-lm. - fascicul libero-lemnos; lb. - liber; lm. -lemn; n. - nucleu; par. - parenchim (ext. - extern; int. - intern); prt. - perete (ext. - extern; int. - intern; lat. - lateral) (orig.)

Diferenţierea unei celule de colenchim

În cursul *perioadei preliminare*, colocitele (celulele de colenchim) au o constituţie citologică variabilă, mergând de la celulele meristematice tipice până la celulele parenchimatice, clorofiliene, puternic vacuolizate, situate în poziţie hipodermică; celulele parenchimatice trebuie mai întâi să se dediferenţieze, redevenind meristematice.

În timpul *perioadei de iniţiere propriu-zisă*, celulele se divid intens, periclin, rezultând un inel sau cordoane de celule sub epidermă. Urmează apoi diviziuni anticline şi oblice,

Scanned with OKEN Scanner

peretelui; creşte numărul de mitocondrii; creşte suprafaţa reticulului endoplasmic; vacuolizarea este bruscă (chiar când colocita s-a alungit doar de 2 ori, are o singură vacuolă mare); ribozomii şi proplastidele suferă o slabă şi lentă diferenţiere.

Fibra de colenchim definitivă este foarte lungă (până la 2 mm), dar strâmtă (pâna la 20 μm lărgime), ascuţită la extremităţi şi adesea divizată transversală, cu peretele (în principal de origine primară) ocupând cam o treime din volumul total al celulei şi diferit îngroşat.

În momentul în care fibra de colenchim a atins dimensiunile definitive, nucleul este mare şi are 1-2 nucleoli, reticulul endoplasmic se fragmentează, plastidele involuează, mitocondriile dispar, vacuola este foarte mare, iar citoplasma ne apare ca o pelicula parietală foarte subţire (ceva mai abundentă şi cu câteva cloroplaste la capetele ascuţite) (Fig. 96).

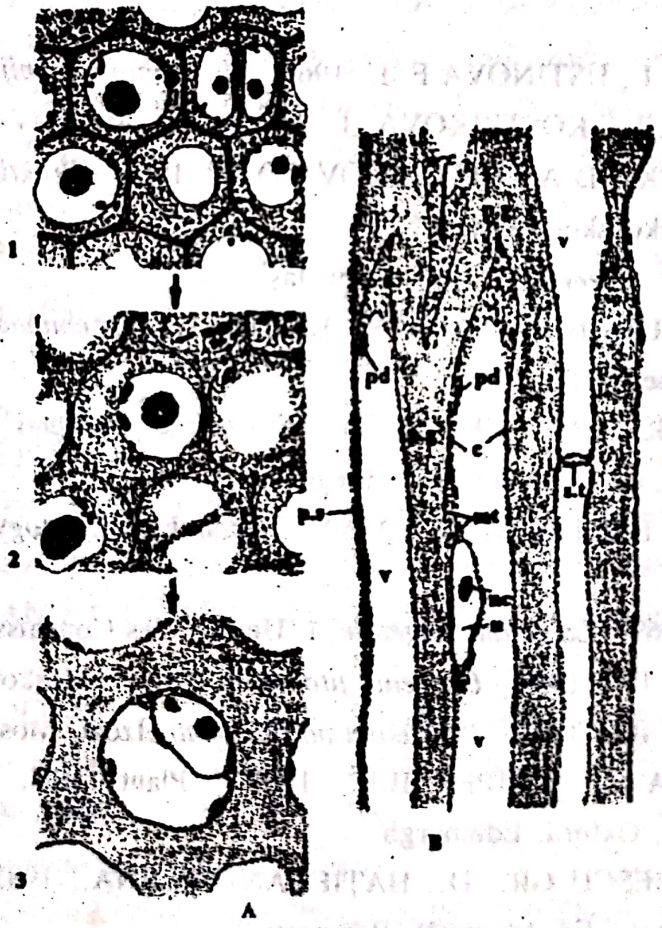


Fig. 96. Diferenţierea celulelor de colenchim; stadii succesive ale procesului de diferenţiere (A: procolenchim - 1; colenchim angular tânăr - 2; colenchim diferenţiat - 3), secţiuni: transversale (A: 1-3), longitudinală (B); **c.** - citoplasmă; **mt.** - mitocondrii; **n.** - nucleu; **nc.** - nucleoid; **pd.** - plastidă; **p.** - perete (g. - gros; **s.** - subţire); **s.t.** - septum transversal; **v.** - vacuolă (d. Toma şi Niţă)

BIBLIOGRAFIE

1. ANGHEL I., BREZEANU AURELIA, TOMA N., 1981 - *Ultrastructura celulei vegetale.* Atlas. Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti
2. ANGHEL I., TOMA N., BREZEANU AURELIA, 1981 - *Practicum de Citologie vegetală.* Ed. Univ. Bucureşti
3. ANGHEL I., VOICA C., 1989 - *Practicum de Biologie. I. Biologie vegetală,* Ed. Univ. Bucureşti
4. ATABEKOVA A.I., USTINOVA E. I., 1967 - *Ţitologhia rastenij.*, Izdat. "Kolos", Moskva
5. BARYKINA R.P., KOSTRIKOVA L. N., KOCEMAROVA I.P., LOTOVA L.I., TRANKOVSKIJ D.A., CISTEAKOVA O.N., 1963 - *Praktikum po anatomii rastenij.* Izdat. "Mosckovskogo Pravda"
6. BĂRA I.I., 1999 - *Genetică.* Ed. Corson, Iaşi
7. BRAUNE W., LEMAN A., TAUBERT H., 1967 - *Pflanzenanatomisches Praktikum.* VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
8. BRONCHART R., 1989/1990 - *Guide des travaux pratiques de biologie de la cellule végétale.* Ed. de l' Université de Liège
9. BROWN V.W., BERTKE M., E., 1969 - *Textbook of Cytology.* Mosby Company, Saint Louis
10. BUVAT R., 1969 - *La cellule végétale*, L'Univers des Connaissances. Hachette, Paris
11. CENŢOVA S., IU., 1984 - *Obşceaia ţitologhia.* Izdat. "Moskovskogo Universiteta"
12. CENŢOVA S., IU., 1988 - *Praktikum po ţitologhij.* Izdat. Moskovskogo Universiteta"
13. CLOWES F.A.L., JUNIPER B.E., 1968 - Plant Cells. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Edinburgh
14. CONSTANTINESCU GR., D., HAŢIEGANU ELENA., 1983 - *Biologia moleculară a celulei vegetale.* Ed. Medicală, Bucureşti
15. COTRUTZ C., COTRUTZ MARIA, KOCSIS MARIA, IONESCU C.R., 1994 - *Manual de lucrări practice de biologie celulară.* Ed. Tehnică, Chişinău
16. DANILOVA M. F., KOZUBOV G.M., 1980 - *Atlas ul'transtruktury rastitel'nyh tkanej.* Izdat. Karelia, Petrozavodk

Scanned with OKEN Scanner

17. DIACONEASA B., 1978 - *Citologie vegetală*. Ed. Univ. Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca
18. FAIN-MAUREL M.A., 1992 - *Biologie de la cellule.*, Ed. Bréal, Paris
19. FILIPESCU GEORGETA, MOŢIU TAMARA, 1980 - *Lucrări practice la citologie vegetală*. Ed. Univ. "Al. I. Cuza", Iaşi
20. GAIER G., 1974 - *Electronnaia histohimia*. Izdat. "Mir", Moskva
21. GUILLAUMIN D., 1980 - *La pratique du microscope électronique à balayage en biologie*. Ed. Masson, Paris. New-York, Barcelone, Milan
22. JUNKIN L. N., RUMIANŢEL P.P., 1965 - *Rukavodstvo no ţitologhij*. Izdat. "Nauka", Moskva-Leningrad
23. KAUSSMANN B., 1963 - *Pflanzenanatomie*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
24. KISELEVA N.S., 1976 - *Anatomia i morfologhia rastenij*. Izdat."Vysşeişaia şkola", Minsk
25. MATIENKO B. T., 1965 - *Ultrastruktura plantelor*. Ed. "Kartea moldovenească". Kişinev
26. MATIENKO B.T., CEHAN E.M., 1973 - *Ul'trastruktura karotinoidoplastov (hromoplstov)*., Izdat. Ştiinţa, Kişinev
27. MOENS P., AUQUIÈRE P.J., LEHMANN-BAERTS M., 1976 - *Notes de laboratoire de biologie végétale*. Univ., Catholique de Louvain
28. MORLOVA IRINA, 1966 - *Lucrări practice de botanică*. Ed. did. şi ped., Bucureşti
29. NULTSCH W., 1986 - *Allgemeine Botanik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
30. PAUŞEVA Z. P., 1988 - *Practikum po ţitologhii rastenij*. "Agropromizdat" Moskva
31. PLOAIE G. P., PETRE ZOE., 1979 - *Introducere în microscopia electronică (cu aplicaţii în biologia celulară şi moleculară)*. Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti
32. ROBERT D., ROLAND J.-C., 1989 - *Biologie végétale. I. Organisation cellulaire*. Ed. Doin, Paris
33. ROLAND J.C., SZOLLOSI A., SZOLLOSI D., 1986 - *Atlas de biologie cellulaire* (éd.2). Ed. Masson, Paris, New York, Barcelone, Milan, Mexico, Sao Paulo
34. SAVOURÉ B., VERGER-LAGADEC F., 1984 - *Étude pratique de la cellule végétale en microscopie photonique*. Ed. Ellipses, Paris
35. SITTE P., 1965 - *Ban und Feinban der Pflanzenzelle*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
36. STRASBURGER E., 1999 - *Lehrbuch der Botanik*. (34. Aufl.). Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin
37. ŞERBĂNESCU-JITARIU GABRIELA, ANDREI M., RĂDULESCU-MITROIU NATALIA, PETRIA ELENA, 1983 - *Practicum de biologie vegetală*. Ed. Ceres, Bucureşti

Scanned with OKEN Scanner

38. TARNAVSCHI I., ŞERBĂNESCU-JITARIU GABRIELA, RĂDULESCU-MITROIU NATALIA, RĂDULESCU DIDONA., 1974 - *Practicum de morfologie şi anatomie vegetală*. Ed. Univ., Bucureşti

39. TOMA C., NIŢĂ MIHAELA, 1985 - *Structura şi ultrastructura ţesuturilor vegetale. În: Probleme actuale de biologie*, II, Soc. Şt., Biol., Bucureşti: 91-130

40. TOMA C., NIŢĂ MIHAELA, 2000 - *Celula vegetală*. Ed. Univ. "Al.I. Cuza" Iaşi

41. TOMA N., ANGHEL I., 1985 - *Citologie vegetală*. Ed. Univ. Bucureşti

42. TRANKOVSKIJ D.A. (sub red.), 1979 - *Praktikum po anatomii rastenij*. Izdat. "Vysşaia şkola", Moskva

43. TROLL W., 1954 - *Allgemeine Botanik*. Fr. Enke Verlag, Stuttgart

44. TUTAIUK B.H., 1980 - *Anatomia i morfologhia rastenij*. Izdat. "Vysşaia skola", Moskva

45. UIDI B., 1975 - *Electronnaia microscopia dlia nacinaiuşcih*. Izdat. "Mir", Moskva

46. WASTIAUX G., 1994 - *La microscopie optique moderne*. Tec. 8 Soc. Lavoisier

47. ZAVARZIN A.A., HARAZOVA A. D., 1982 - *Osnovyobşcei ţitologhij*. Izdat. 'Leningradskogo Instituta

TIPARUL EXECUTAT LA
CENTRUL DE MULTIPLICARE AL
EDITURII UNIVERSITĂŢII „AL. I. CUZA"
6600 Iaşi, Str. Păcurari nr. 9, tel. 032-114947
Format: 61×86/8
Coli tipo: 22,50
Apărut: 2001
Comanda: 112

Scanned with OKEN Scanner